

INTERNATIONAL COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents
United States Patent and Trademark
Office
Box PCT
Washington, D.C. 20231
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

| | |
|---|---|
| Date of mailing (day/month/year) 15 May 2000 (15.05.00) | Applicant's or agent's file reference K4-002PCT |
| International application No. PCT/JP99/05789 | Priority date (day/month/year) 21 October 1998 (21.10.98) |
| International filing date (day/month/year) 20 October 1999 (20.10.99) | |
| Applicant AIZAWA, Chikara et al | |

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

07 April 2000 (07.04.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:2. The election ☒ was☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

| | |
|--|---|
| The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland | Authorized officer Maria Kirchner |
| Facsimile No.: (41-22) 740.14.35 | Telephone No.: (41-22) 338.83.38 |

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT

EP



国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
[PCT18条、PCT規則43、44]

| | | |
|-----------------------------|---|-------------------------|
| 出願人又は代理人 の書類記号 K4-002PCT | 今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220) 及び下記5を参照すること。 | |
| 国際出願番号 PCT/JP99/05789 | 国際出願日 (日.月.年) 20.10.99 | 優先日 (日.月.年) 21.10.98 |
| 出願人(氏名又は名称) 社団法人 北里研究所 | | |

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 _____ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K39/39, 39/145, 39/15, 39/165, 39/20, 39/21,
39/10, 39/07, 39/02, 39/108, 39/118, 39/00, 39/015, 39/012,
39/116, 39/295, A61P31/04, 31/12, 31/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K39/39, 39/145, 39/15, 39/165, 39/20, 39/21,
39/10, 39/07, 39/02, 39/108, 39/118, 39/00, 39/015, 39/012,
39/116, 39/295, A61P31/04, 31/12, 31/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), WPIDS (STN)

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|--|------------------|
| X | LIANG, X., et al., 'Cholera toxin as a mucosal adjuvant: Glutaraldehyde treatment dissociates adjuvanticity from toxicity' J. Immunol., 1989, Vol.143, No.2, pp.484-490, 全文参照 | 1 - 12 |
| X | WO, 98/18928, A1 (CHIRON S.P.A.), 7. 5月. 1998 (07. 05. 98), 図3-9(B)参照 & EP, 941333, A1 | 1-5, 7-12 |

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

21. 01. 99

国際調査報告の発送日

21. 01. 99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

大宅 郁治

4C

9639

電話番号 03-3581-1101 内線 3452



THIS PAGE BLANK (USPTO)

| C (続き) 関連すると認められる文献 | | |
|---------------------|--|---------------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
| X Y | WO, 98/42375, A1 (CHIRON CORPORATION), 1. 10月. 1998 (01. 10. 98), 第4頁第1行-第5頁第23行, 第7頁第26行-第9頁第8 行, 第17頁第24行-第20頁第12行及び実施例1-5 & AU, 9865713, A | 1 - 8 9 - 12 |
| X Y | WO, 95/34323, A2 (CONNAUGHT LABORATORIES LIMITED), 21. 12月. 1995 (21. 12. 95), 第7頁第30行-第11頁第25行, 実施例11, 表1a, 1b 及び図5, 6 & EP, 764029, A1 | 1-5, 7, 8 9 - 12 |
| Y | WO, 95/17211, A1 (BIOCINE S.P.A.), 29. 6月. 1995 (29. 06. 95), 第5頁第9行-第12頁第19行及び図1a-5 & EP, 732937, A1 & JP, 10-500099, A | 1 - 12 |
| Y | DE GRAVE, D., et al., 'Enhancement of the humoral immunity against HBSAG by Pertussis toxin' Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent, 1989, Vol.54, No.4b, pp.1553-1555, 全文参照 | 1 - 12 |
| A | RYAN, M., et al., 'Pertussis toxin potentiates Th1 and Th2 responses to co-injected antigen: adjuvant action is associated with enhanced regulatory cytokine production and expression of the co-stimulatory molecules B7-1, B7-2, and CD28' Int. Immunol., May 1998, Vol.10, No.4, pp.651- 662, 全文参照 | 1 - 12 |

THIS PAGE BLANK (USPTO)

8T

特 許 協 力 条 約

PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
[PCT36条及びPCT規則70]

REC'D 13 OCT 2000

WIPO

PCT

| | | |
|--|---|-------------------------|
| 出願人又は代理人 の書類記号 K4-002PCT | 今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。 | |
| 国際出願番号 PCT/J P 99/05789 | 国際出願日 (日.月.年) 20.10.99 | 優先日 (日.月.年) 21.10.98 |
| 国際特許分類 (IPC) Int. Cl ⁷ A61K39/39, 39/145, 39/15, 39/165, 39/20, 39/21, 39/10, 39/07, 39/02, 39/108, 39/118, 39/00, 39/015, 39/012, 39/116, 39/295, A61P31/04, 31/12, 31/00 | | |
| 出願人 (氏名又は名称) 社団法人 北里研究所 | | |

| |
|---|
| 1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条 (PCT36条) の規定に従い送付する。 |
| 2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 5 ページからなる。 <input type="checkbox"/> この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。 (PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照) この附属書類は、全部で ページである。 |
| 3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。 I <input checked="" type="checkbox"/> 国際予備審査報告の基礎 II <input type="checkbox"/> 優先権 III <input type="checkbox"/> 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成 IV <input type="checkbox"/> 発明の単一性の欠如 V <input checked="" type="checkbox"/> PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明 VI <input type="checkbox"/> ある種の引用文献 VII <input type="checkbox"/> 国際出願の不備 VIII <input checked="" type="checkbox"/> 国際出願に対する意見 |

| | | |
|---|------------------------------|----------|
| 国際予備審査の請求書を受理した日 07.04.00 | 国際予備審査報告を作成した日 28.09.00 | |
| 名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号 | 特許庁審査官 (権限のある職員) 新留 豊 | 4 C 9639 |
| | 電話番号 03-3581-1101 内線 3452 | |

様式PCT/IPEA/409 (表紙) (1998年7月)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
 PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 _____ 項、 出願時に提出されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 _____ ページ/図、 出願時に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならない、本報告に添付する。)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

| | | | |
|---------------|-------|-----------|---|
| 新規性(N) | 請求の範囲 | 6 | 有 |
| | 請求の範囲 | 1-5, 7-12 | 無 |
| 進歩性(IS) | 請求の範囲 | | 有 |
| | 請求の範囲 | 1-12 | 無 |
| 産業上の利用可能性(IA) | 請求の範囲 | 1-12 | 有 |
| | 請求の範囲 | | 無 |

2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

(国際調査報告に引用された文献)

文献1: LIANG, X., et al., 'Cholera toxin as a mucosal adjuvant: Glutaraldehyde treatment dissociates adjuvanticity from toxicity' J. Immunol., 1989, Vol.143, No.2, pp.484-490

文献2: WO, 98/18928, A1 (CHIRON S.P.A.),
7. 5月. 1998 (07. 05. 98)

文献3: WO, 98/42375, A1 (CHIRON CORPORATION),
1. 10月. 1998 (01. 10. 98)

文献4: WO, 95/34323, A2 (CONNAUGHT LABORATORIES LIMITED),
21. 12月. 1995 (21. 12. 95)

文献5: WO, 95/17211, A1 (BIOCINE S.P.A.),
29. 6月. 1995 (29. 06. 95)

文献6: DE GRAVE, D., et al., 'Enhancement of the humoral immunity against HBSAG by Pertussis toxin' Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent, 1989, Vol.54, No.4b, p.1553-1555

(説明)

文献2、4、5には、*E. coli*のLT-Aトキシン、百日咳ホロトキシン等のトキシンあるいはそれらのサブユニットを減毒化し、残存トキシン活性を天然体の1/2000、さらには1/10000以下とした減毒化トキシンを含むアジュバントが記載されている。

よって、請求の範囲1-5, 7-12に係る発明は新規性を有さない。

文献1には化学的手法により天然体の1/1000に減毒化したコレラトキシンを用いたアジュバントが記載されている。

文献2-4には、減毒化の程度として、1/10000以下にすることが好ましいことが記載されている。

(補充欄に続く)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

VII. 国際出願に対する意見

請求の範囲、明細書及び図面の明瞭性又は請求の範囲の明細書による十分な裏付についての意見を次に示す。

請求の範囲 1 - 4 :

明細書中で実際に用いられたトキシンの種類を考慮すれば、これらの請求項が合理的かつ正当化されるものであるかどうかは疑問である。

さらに、そのアミノ酸配列中に、特定残基があるか無いかという点によるトキシンの特定は、所望の効果を発揮しないようなトキシンをも当業者に想起させる得るものである。

したがって、上記請求の範囲の明確性に疑問があり、それに係る発明の裏付けも不十分である。

よって出願人は、請求の範囲 1 に記載のトキシンを、所望の効果を実際に発揮しうるようなものに限定し、新たな効果を奏するアジュバントの提供という、本願の課題を実際に解決しうるような請求の範囲とすべきである。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

補充欄 (いずれかの欄の大きさが足りない場合に使用すること)

第 V 欄の続き

したがって、減毒化の程度を $1/10000$ 以下と決定し、文献1に記載のと同様の化学的処理により、残存トキシン活性 $1/1000$ と比較して1オーダー少ない程度の、極めて近い範囲で変更してみることは、当業者に自明の事項である。

また、トキシンの無毒化にホルマリンを用てみることも、文献6に開示されているとおり、公知の技術である。

さらに、上記変更による格別な効果も認められない。

したがって、請求の範囲1-12に係る発明は、進歩性を有さない。

請求の範囲1-12に係る発明は、産業上の利用可能性を明らかに有する。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

1001
6T
Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

| | | |
|--|---|--|
| Applicant's or agent's file reference K4-002PCT | FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416) | |
| International application No. PCT/JP99/05789 | International filing date (<i>day/month/year</i>) 20 October 1999 (20.10.99) | Priority date (<i>day/month/year</i>) 21 October 1998 (21.10.98) |
| International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A61K 39/39, 39/145, 39/15, 39/165, 39/20, 39/21, 39/10, 39/07, 39/02, 39/108, 39/118, 39/00, 39/015, 39/012, 39/116, 39/295, A61P 31/04, 31/12, 31/00 | | |
| Applicant THE KITASATO INSTITUTE | | |

| | |
|--|--|
| <p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>4</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of _____ sheets.</p> | |
| <p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p> | |

| | |
|---|--|
| Date of submission of the demand 07 April 2000 (07.04.00) | Date of completion of this report 28 September 2000 (28.09.2000) |
| Name and mailing address of the IPEA/JP | Authorized officer |
| Facsimile No. | Telephone No. |

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/05789

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the claims:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the drawings:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☒ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/05789

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

| | | | |
|-------------------------------|--------|----------|-----|
| Novelty (N) | Claims | 6 | YES |
| | Claims | 1-5,7-12 | NO |
| Inventive step (IS) | Claims | | YES |
| | Claims | 1-12 | NO |
| Industrial applicability (IA) | Claims | 1-12 | YES |
| | Claims | | NO |

2. Citations and explanations

The following documents were cited in the international search report.

Document 1: Liang, X., et al., "Cholera toxin as a mucosal adjuvant: Glutaraldehyde treatment associates adjuvant activity from toxicity," J. Immunol., Vol. 143, No. 2, 1989, pp. 484-490

Document 2: WO, 98/18928, A1 (Chiron S.P.A.) 7 May 1998 (07.05.98)

Document 3: WO, 98/42375, A1 (Chiron Corporation) 1 October 1998 (01.10.98)

Document 4: WO, 95/34323, A2 (Connaught Laboratories Limited) 21 December 1995 (21.12.95)

Document 5: WO, 95/17211, A1 (Biocine S.P.A.) 29 June 1995 (29.06.95)

Document 6: De Grave, D., et al., "Enhancement of the humoral immunity against HBsAg by Pertussis toxin," Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent, Vol. 54, No. 4b, 1989 pp. 1553-1555

(Commentary)

Documents 2, 4, and 5 describe adjuvant containing toxins such as the E. coli LT-A toxin, pertussis holotoxin, and the like or their attenuated toxins in which the subunits have been attenuated such that the residual toxin activities are less than 1/2000 and 1/10,000 that of the natural toxin.

Therefore, the inventions described in Claims 1-5 and 7-12 do not appear to be novel.

Document 1 describes an adjuvant in which the cholera toxin has been attenuated to 1/1000 that of the natural toxin by chemical means.

Documents 2-4 state that the preferred level of attenuation is 1/10000 or less.

Therefore, setting the level of attenuation at 1/10000 or less, and changing it by the same chemical means as described in document 1 so that the range of residual toxin activity is extremely close to that level of attenuation, i.e., one order smaller than 1/1000, are matters that are obvious to persons skilled in the art.

In addition, as disclosed in document 6, attenuation of toxins by the use of formalin is a widely known technique.

Furthermore, this examination does not find any particular advantage to changing the level of attenuation as described above.

Therefore, the inventions described in Claims 1-12 do not appear to involve an inventive step.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/05789

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

Claims 1-4:

When we consider the types of toxins that are actually used in the Specification, there is some doubt as to whether the matters described in these claims are logical and valid.

In addition, stipulation of the toxins by properties such as whether a specific residue is present in or absent from the amino acid sequence can be envisioned by persons skilled in the art to include toxins that do not exhibit the desired effect.

Therefore, this situation calls into doubt the accuracy of the above claims and is insufficient support for the inventions described therein.

As a result, the applicant should limit the toxins described in Claim 1 to those that actually exhibit the desired effect and should present a claim that can actually solve the problem presented in this application, i.e., provide an adjuvant that exhibits a novel effect.

THIS PAGE BLANK (USPTO)



特許協力条約に基づいて公開された国際出願

| | | |
|--|---|--|
| (51) 国際特許分類7 A61K 39/39, 39/145, 39/15, 39/165, 39/20, 39/21, 39/10, 39/07, 39/02, 39/108, 39/118, 39/00, 39/015, 39/012, 39/116, 39/295, A61P 31/04, 31/12, 31/00 | A1 | (11) 国際公開番号 WO00/23107 (43) 国際公開日 2000年4月27日(27.04.00) |
| (21) 国際出願番号 PCT/JP99/05789 (22) 国際出願日 1999年10月20日(20.10.99) (30) 優先権データ 特願平10/300219 1998年10月21日(21.10.98) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 社団法人 北里研究所 (THE KITASATO INSTITUTE)[JP/JP] 〒108-8642 東京都港区白金5丁目9番1号 Tokyo, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 相澤主税(AIZAWA, Chikara)[JP/JP] 鈴木雄次郎(SUZUKI, Yuzi-ro)[JP/JP] 佐藤隆昭((SATO, Taka-aki)[JP/JP] 渡辺浩志(WATANABE, Koji)[JP/JP] 服部信章(HATTORI, Nobuaki)[JP/JP] 田中芳武(TANAKA, Yoshitake)[JP/JP] 〒364-0026 埼玉県北本市荒井六丁目111番地 社団法人 北里研究所 生物製剤研究所内 Saitama, (JP) 大村 智(OMURA, Satoshi)[JP/JP] 〒108-8642 東京都港区白金5丁目9番1号 社団法人 北里研究所内 Tokyo, (JP) | (74) 代理人 弁理士 清水初志, 外(SHIMIZU, Hatsushi et al.) 〒300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki, (JP) (81) 指定国 AU, BR, CA, CN, IN, JP, KR, MX, RU, US, 欧州 特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE) 添付公開書類 国際調査報告書 | |
| (54)Title: VACCINE PREPARATIONS CONTAINING ATTENUATED TOXIN (54)発明の名称 減毒化トキシンを含むワクチン製剤 (57) Abstract An adjuvant containing as the active ingredient an attenuated toxin having a residual activity of 1/2000 or less than the activity of the natural toxin; and vaccines containing this adjuvant. By using, for example, attenuated natural cholera toxin, vaccines capable of showing sufficient immune enhancement in percutaneous vaccination or nasal vaccination can be presented. | | |

(57)要約

残存活性が天然体トキシンの 1/2000 以下の減毒化トキシンを有効成分として含むアジュバント、並びにこのアジュバントを含むワクチンにより前記課題を解決する。例えば天然コレラトキシンの減毒化体の利用により、経皮接種、および経鼻接種においても十分な免疫増強性を示すワクチンを提供する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

| | | | | | | | |
|----|--------------|----|---------|----|----------------|----|------------|
| AE | アラブ首長国連邦 | DM | ドミニカ | KZ | カザフスタン | RU | ロシア |
| AL | アルバニア | EE | エストニア | LC | セントルシア | SD | スーダン |
| AM | アルメニア | ES | スペイン | LI | リヒテンシュタイン | SE | スウェーデン |
| AT | オーストリア | FI | フィンランド | LK | スリ・ランカ | SG | シンガポール |
| AU | オーストラリア | FR | フランス | LR | リベリア | SI | スロヴェニア |
| AZ | アゼルバイジャン | GA | ガボン | LS | レソト | SK | スロヴァキア |
| BA | ボスニア・ヘルツェゴビナ | GB | 英国 | LT | リトアニア | SL | シエラ・レオネ |
| BB | バルバドス | GD | グレナダ | LU | ルクセンブルグ | SN | セネガル |
| BE | ベルギー | GE | グルジア | LV | ラトヴィア | SZ | スワジランド |
| BF | ブルキナ・ファソ | GH | ガーナ | MA | モロッコ | TD | チャード |
| BG | ブルガリア | GM | ガンビア | MC | モナコ | TG | トーゴ |
| BJ | ベナン | GN | ギニア | MD | モルドヴァ | TJ | タジキスタン |
| BR | ブラジル | GW | ギニア・ビサオ | MG | マダガスカル | TZ | タンザニア |
| BY | ベラルーシ | HR | ギリシャ | MK | マケドニア旧ユーゴスラヴィア | TM | トルクメニスタン |
| CA | カナダ | HU | クロアチア | | 共和国 | TR | トルコ |
| CC | 中央アフリカ | ID | インドネシア | ML | マリ | TT | トリニダード・トバゴ |
| CG | コンゴ | IE | アイルランド | MN | モンゴル | UA | ウクライナ |
| CH | スイス | IL | イスラエル | MR | モリタニア | UG | ウガンダ |
| CI | コートジボアール | IN | インド | MW | マラウイ | US | 米国 |
| CM | カメルーン | IS | アイスランド | MX | メキシコ | UZ | ウズベキスタン |
| CN | 中国 | IT | イタリア | NE | ニジェール | VN | ヴェトナム |
| CR | コスタ・リカ | JP | 日本 | NL | オランダ | YU | ユーゴスラビア |
| CU | キューバ | KE | ケニア | NO | ノルウェー | ZA | 南アフリカ共和国 |
| CY | キプロス | KP | 北朝鮮 | NZ | ニュージーランド | ZW | ジンバブエ |
| CZ | チェッコ | KR | 韓国 | PL | ポーランド | | |
| DE | ドイツ | | | PT | ポルトガル | | |
| DK | デンマーク | | | RO | ルーマニア | | |

明細書

減毒化トキシンを含むワクチン製剤

技術分野

本発明は、減毒化トキシンをアジュバントとして含む、治療と予防に有用なワクチン製剤に関するものである。

背景技術

ワクチンは、種々の疾病の予防に用いられ、数々の成果をあげてきた。しかしながら、ワクチンの副作用や、また効果が充分でないという例も多くあって、その改善が強く望まれている。現在、人体用または動物用に使用されているワクチンの多くは、病原体あるいは病原体の一部を取り出し、ワクチンの抗原材料として用いる。従って、病原体を構成する成分や病原体を増殖させる媒体の成分がワクチンに混入する可能性を否定できない。これはワクチン接種の際、望ましくない副反応を引き起こす原因となりうる。また、免疫賦与に働く抗原部位そのものも多量に接種されると副反応を誘発する場合もある。

このようなことをできるだけ避け、安全性に優れたワクチンを製造する方法として、ワクチン抗原の接種量を少なくすることや、ワクチン抗原の純度を高めること、注射以外の接種ルートで投与することなどが行われる。しかし、一般的には、これに伴いワクチンの免疫力が低下しやすい問題点がある。この点に対する有効な方策として、従来、アジュバントを用いることが実施されてきた。しかし、ここでも、アジュバントの有効性と安全性の向上など、改善すべき課題が残っている。

従来、ほとんどのワクチンは注射により接種されている。この結果、血中抗体価が上昇し、それが持続すれば病原微生物の増殖が抑制され、病気が予防される。

一方、インフルエンザウイルスなど多くのウイルスや細菌は気道粘膜を介して感染するので、感染の初期段階で罹患を阻止するためには、血中よりも粘膜での局所免疫を強力に誘発するワクチンが望ましい。このためには局所免疫を誘発しやすくする優れたアジュバントが必要である。すなわち、抗原の種類や接種ルートに応じた、有効で安全性の高い、優れたアジュバントを開発することは、ワクチン開発にとって必要な課題である。

注射以外の接種ルートとして注目されるのは経口接種、経皮接種あるいは経鼻接種である。注射は医療技術者が行わなければならないので、例えば、医療施設が完備されていない状況で広範囲の人々にワクチンを接種するときには、困難をともなう。これに対し、経口、経皮あるいは経鼻接種では、ワクチン製剤が入手できれば、専門家の指導の下に、直接の助けが無くとも接種が可能である。しかし、一般的にこのような接種ルートでは十分な免疫刺激を得にくいいため、やはりそれに適したアジュバントが求められる。

従来、ワクチンにはアジュバントとしてアルミニウム化合物（硫酸アルミニウム、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウムなど）が広く用いられて来た。アルミニウム化合物のゲルは、現在、人体用ワクチンに用い得るほとんど唯一のアジュバントである。しかし、アルミニウムアジュバントにはいくつかの問題点があり、改善が求められている。具体的には、たとえば次のような問題点が指摘されている。

1) 製法、及び取り扱い上の問題として、製造のロットごとに品質が変化しやすいので、大量生産に不向きで、加えてカラム操作に馴染みにくいなど、取り扱い上も不便である。

2) 効果上の問題として、液性免疫の誘発力に優れているものの、これに比べて細胞性免疫の誘発力が低いので、用いる抗原に限界がある。

これらの改善を目的として、細菌トキシンなど新しいアジュバントの研究、開発が進められている。それらを例示すれば次のものが挙げられる。

1. コレラトキシン等、細菌トキシン
2. サポニン類、高級脂肪酸など界面活性作用物質。
3. BCG、ムラミルペプチド等、微生物または植物成分。
4. インターロイキンなどのサイトカイン類、熱ショック蛋白質などの機能蛋白質。
5. 合成ポリアニオン、ポリカチオンなど。
6. マイクロキャリアなど。

細菌トキシンがアジュバント活性（すなわち、抗原特異的抗体産生増強作用）を有することは知られている。その中で、コレラトキシンのアジュバント活性は相対的に高い(J. Holmgren et al., Vaccine 11, 1179-1184, 1993)。本発明者らは、コレラトキシンや大腸菌易熱トキシン、およびそのサブユニットをアジュバントとして含むワクチンの開発研究を続けてきた（特開平 2-243633 号）。

このほか、現在進行中のコレラトキシン、大腸菌易熱トキシン、百日せきトキシンなどをアジュバントとするワクチンの開発研究を例示すれば、つぎのものが挙げられる。すなわち、インフルエンザワクチン(K. Komase et al., Vaccine 16, 248-254, 1998; A. S. Tamura et al., Eur. J. Immunol. 21, 1337-1344, 1991)、ヘルペスシンプレックスウイルス(C. M. Richards et al., Vaccine 15, 1065-1069, 1997)、HIV-I ワクチン(I. M. Belyakov et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 1709-1714, 1998)、ヘリコバクター・ピロリワクチン(R. Weltzin et al., Vaccine 15, 370-378, 1997)、トキソプラズマワクチン(I. Bourgiun et al., FEMS Immunol. Med. Microbiol 12, 121-126, 1995)、麻しんワクチン(C. D. Partidos et al., Immunology 89, 483-487, 1996)、ポリオワクチンなどである。

しかし細菌トキシンは、本来ヒトに対して毒性を持っているため、アジュバントとして加えたワクチンを臨床使用する際に問題となる可能性がある。本発明者らは、アジュバントとして有効なトキシンの濃度はヒトや動物に毒性を示す量よりも十分に低く、ワクチンに使用しても安全であると考えて、経鼻接種を想定した繰り返し投与に伴う問題についても検討し既に発表している(S. Tamura et al.,

Vaccine 15,1784-1790,1997)。それでも多くの専門家は、ヒトと実験動物のコレラトキシン感受性の差や下痢を引き起こす可能性などの理由をあげて、安全性に対する懸念を表明している (M.M. Levine et al. Microb. Rev.47,510-550, 1983)。

細菌トキシンの優れた免疫増強活性を生かしながら安全性の問題を解決するために、以下の方法が提案されてきた。しかしいずれの方法も、安全性とアジュバント活性の両立という課題を完全に達成するものとは言いがたい。

(1) 化学的、物理的処理による減毒化

ホルマリン、グルタルアルデヒド、酸、アルカリなどの存在下、またはトキシンにとって過酷な温度条件下などで処理し、トキシン活性を低下させ、なおかつ、アジュバント活性を残す方法である。グルタルアルデヒド処理によりトキシン活性を天然体の約 1/1000 にしたコレラトキシンは、アジュバント活性を示すことが知られている (X. Liang et al., J. Immunol.143,484-490,1989)。しかし天然体の 1/1000 のトキシン活性では安全性の点からは不十分と評価される。

(2) 変異株の生産する交差反応性変異蛋白質の探索

トキシン生産性細菌を変異誘起化学薬品で処理し、得られた変異株の生産するトキシンの中から、アジュバント活性を維持した目的物を探索する方法である。百日せきトキシン生産菌の変異株の培養液中から、トキシン活性が低く、かつ、抗百日せきトキシン抗体と反応する交差反応性蛋白質 (CRM) が見いだされた。この変異トキシンは、免疫原性があり、百日せきワクチン抗原の候補と考えられる (Y. Sato et al., Devop. Biolo. Standard.73, 93-107, 1991)。それと同時に低トキシン活性のアジュバントとなる可能性があるが、トキシン活性の程度とアジュバント活性については報告されていない。

ジフテリアトキシンの交差反応性蛋白質 CRM-197 (DT-G52E) (T.Uchida et al., J.Biol.Chem.248,3838-3844,1973; G.Giannini et al.,Nucleic Acids Res.12, 4063-4069,1984)、緑膿菌エンテロトキシン A の交差反応性蛋白質 CRM-66(H462Y) (S.J.Cryz et al.,Rev.Infec.Dis.5 Suppl.5,S992-S997,1983. S.P.Kessler

et al., J. Biol. Chem. 267, 19107-19111, 1992)などは、ADP-リボシル化酵素(ADP-ribose transferase)活性を実質的に消失した変異体トキシンとして報告された。これらの変異体トキシンにおいては、ADP-リボシル化酵素活性がトキシン活性の唯一の指標とされており、他の機構による残存トキシン活性は否定されていない。したがってこれらの変異体には、他のトキシン活性を伴っている可能性がある。しかも CRM-197 (DT-G52E) は、多糖抗原と化学結合させた場合、アジュバント活性はあるものの十分な抗体価を得られないので、第二のアジュバントを必要とすると報告されている (G.S. Bixler et al., Adv. Exp. Med. Biol. 303, 185-190, 1991. D.M. Granoff et al., Vaccine 11 Suppl. 1, S46-S51, 1993)。

(3) 遺伝子操作による減毒化変異トキシンの作成

遺伝子組み換え技術により、トキシン分子のアミノ酸残基の1ないし数箇所を人為的に変化させてトキシン活性を下げ、なおかつアジュバント活性を維持した組み換えトキシンを作成する方法である。一例として大腸菌易熱トキシンのN末端から7番目または192番目のアルギニン残基(Arg/R)をリジン残基(Lys/K)に (LT-R7K, M.T. De Magistris et al., Dev. Biol. Stand. 92, 123-126, 1998)、あるいはグリシン残基(Gly/G)に (LT-R192G, B. L. Dickinson et al., Infection Immun. 63, 1617-1623, 1995) 置換した組み換え体は、実質的にトキシン活性が消失し、なおアジュバント活性があったと報告された。

しかし、別のグループの試験によれば、上記の組み換え体には無視できない程度のトキシン活性がみとめられ、また天然体に比較して不安定性であり、同じレベルの抗体価を与えるためには天然トキシンより多量に用いなければならないと報告された (K. Komase et al., Vaccine 16, 248-254, 1998; C.C.R. Grant et al., Infect. Immun. 62, 4270-4278, 1994)。複数の活性によってトキシン活性がもたらされている場合、そのうちのいずれかの活性が低下すると他の活性が顕在化することがある。トキシンの減毒化には、常にこの現象が伴うので、トキシン活性の指標は慎重に選択されるべきである。以上のように、これまで低毒性であると報



告された減毒化アジュバントは、アジュバント活性、安全性、安定性、あるいは生産性の問題が十分に解決されていない。また、アミノ酸の置換に基づいてトキシン活性の低下とアジュバント活性の維持という相反する課題を達成するのは、多くのスクリーニングを繰り返さなければならないために、時間のかかる作業とすることができる。

発明の開示

本発明の課題は、トキシンの優れたアジュバント活性を残しながら、トキシン活性が実質的に無い減毒化トキシンを新規アジュバントとして提供することである。更に本発明は、このような安全性と有効性とを兼ね備え、しかもより容易な手法によって得ることができるアジュバントを利用したワクチンの提供を課題としている。より具体的には、ワクチンの使用量を減らしたり、注射以外の接種ルートを用いても免疫力が低下しないようなワクチンの提供を課題としている。

本発明者らは各種トキシンのトキシン活性軽減方法について研究をすすめた結果、化学処理により得ることができる、トキシン活性を実質的に持たない減毒化トキシンが、実用的な水準のアジュバント活性を有する事を見い出した。そしてこの減毒化トキシンに高い安全性が期待できることを確認して本発明を完成した。すなわち上記の課題は、以下の本発明により達成される。

- (1) 天然のトキシンを構成するアミノ酸配列中、セリン残基、グルタミン酸残基、およびリジン残基を保持しているトキシン、またはそのサブユニットを減毒化し、残存トキシン活性を天然体の 1/2000 以下とした減毒化トキシンを含むアジュバント。
- (2) トキシンが、天然トキシンのアミノ酸配列に対し 1、若しくは複数のアミノ酸を置換、挿入、欠失および／または付加したアミノ酸配列によって構成された、アジュバント活性を持つ変異体である (1) に記載のアジュバント。

- (3) トキシンが天然のトキシンである(1)に記載のアジュバント。
- (4) トキシンが細菌トキシンである(1) - (3)のいずれかに記載のアジュバント。
- (5) トキシンが、コレラトキシン、百日せきトキシン、病原性大腸菌易熱性トキシン、ブドウ球菌 α トキシン、ブドウ球菌 β トキシン、および腸炎ビブリオ菌耐熱性溶血トキシンで構成される群から選択される少なくとも1つのトキシンである(4)に記載のアジュバント。
- (6) トキシンが天然コレラトキシンであり、ホルマリン処理によって減毒化しそのトキシン活性を1/2000以下とした(5)に記載のアジュバント。
- (7) トキシン活性が1/10000以下である(6)に記載のアジュバント。
- (8) (1) - (7)のいずれかに記載のアジュバントと免疫抗原を含むワクチン製剤。
- (9) 経鼻接種のためのものである請求項8に記載のいずれかのワクチン製剤。
- (10) 経口接種のためのものである(8)に記載のいずれかのワクチン製剤。
- (11) 経皮接種のためのものである(8)に記載のいずれかのワクチン製剤。
- (12) 免疫抗原が、インフルエンザウイルス、ロタウイルス、麻疹ウイルス、風疹ウイルス、おたふくかぜウイルス、エイズウイルス、百日せき菌、ジフテリア菌、ヘリコバクター・ピロリ菌、出血性大腸菌(EHEC)、クラミジア原虫、マイコプラズマ原虫、マラリア原虫、コクシジジウム原虫、および住血吸虫で構成される群から選択される単一または複数の病原微生物の抗原である(8)に記載のいずれかのワクチン製剤。

あるいは本発明は、減毒化トキシンのアジュバントとしての使用に関する。更に本発明は、減毒化トキシンのワクチン製剤を製造するための使用に関する。

本発明のアジュバントを構成するトキシンは、トキシン活性を実質的に持たず、免疫増強活性は残っている減毒化トキシンである。本明細書において、トキシン活性を実質的に持たないとは、天然トキシンを基準として1/2000以下のトキシン



活性しか保持していないことと定義される。コレラトキシン、大腸菌易熱トキシン、百日せきトキシン、ジフテリアトキシン、あるいは破傷風トキシンといった、代表的な細菌トキシンの活性は、たとえば ADP-リボシル化酵素活性を指標として比較することができる。すなわち、たとえば ADP-リボシル化酵素活性が 1/2000 であれば、それはトキシン活性が 1/2000 であることを意味する。先行技術文献には各種減毒化トキシンについて ADP リボシル化酵素活性が検出されないとしている報告があるが、定量的な比較を伴わないものは、その判断基準が明確でないのでトキシン活性の評価方法として適切ではない。また、他の報告との比較が困難となる点で問題がある。本発明では、トキシン活性の比較におけるこのような弊害を避けるために、天然トキシンの活性を基準として、その 1/2000 という比較基準を採用した。コレラトキシンや、大腸菌易熱トキシンのような、強力な生理活性を持った細菌トキシンであっても、1/2000 という高レベルな減毒化によって、生体への投与におけるその安全性は飛躍的に高まる一方、免疫刺激活性は維持される。

この他、動物細胞や実験動物の生理的な応答反応を指標としたバイオアッセイの結果を指標としてトキシン活性の定量的な比較を行うこともできる。いずれにせよ、そのトキシンが持つ活性を鋭敏に反映する指標により、活性の比較を行って 1/2000 以下であることを確認するのが望ましい。また、多くのトキシンは多面的な生理活性を持っていることから、たとえ鋭敏な指標を利用するとしても、性格の異なる複数の指標を組み合わせてトキシン活性を評価することは安全性の確保の上で望ましいやり方である。各トキシンとその活性については後述する。本発明による減毒化トキシンは、通常は 1/2000 以下、望ましい態様においては 1/10000 以下のトキシン活性を持つものとする。

トキシンの減毒化は、公知の方法によって達成することができる。すなわち、化学的な処理、あるいは物理的処理による減毒化技術が公知である。減毒化処理にともなって、立体構造の不可逆的な変化、サブユニットの解離、あるいはペプ

チドの断片化といった様々な構造変化が起きる可能性がある。しかし、前記3種類のアミノ酸残基を保持したトキシンを用いれば、アジュバント活性を維持することが可能である。これら公知の手法を用い、前記トキシン活性の指標を与える分析方法によってトキシン活性が少なくとも天然のトキシン活性の 1/2000 以下となる条件を経験的に設定すれば良い。具体的な減毒化の条件については、後に詳細に述べる。

本発明のトキシンとしては、後に具体的な例を列挙するようないずれのトキシンを用いる場合であっても、天然体のトキシンを構成するアミノ酸配列中、セリン残基、グルタミン酸残基、およびリジン残基は保持されていなければならない。本発明における望ましいトキシンは、天然体トキシンである。天然体トキシンを選択することにより、高いアジュバント活性を期待できると共に、変異体をスクリーニングする手間を省くことができる。なお、アジュバント活性の維持に重要なこれらのアミノ酸残基以外については、1、若しくは複数のアミノ酸を置換、欠失、挿入および／または付加したアミノ酸配列を持つ変異体であることができる。またアミノ酸配列のみならず、他のトキシン構成成分である糖残基の変異体であることもできる。

蛋白質の機能発現にとって、アミノ酸残基の官能基は重要である。例えば、OH基を持つセリン残基やスレオニン残基など、COOH基を持つグルタミン酸残基やアスパラギン酸残基など、あるいは NH₂基を持つリジン残基やアルギニン残基などが活性中心を構成し、活性発現に重要な役割を果たしている場合が多い。多くの酵素や機能性蛋白質に見られるとおり、トキシンにおいてもその生物活性、例えば、酵素活性、免疫増強活性、受容体結合活性などの活性発現に、トキシン分子を構成するアミノ酸残基中の OH基、COOH基、NH₂基などが深く関与すると考えられる。更に、例えば OH基の重要性を示す別の指標として構成アミノ酸数を見た場合、OH基を持つアミノ酸であるセリン残基、スレオニン残基、そしてチロシン残基は、コレラトキシン、ヒト型大腸菌易熱トキシン、百日せきトキシンのポリペ



プチド中に、3種のアミノ酸残基数の合計でそれぞれ約18%、22%、20%を占める。この数字は、それだけ活性中心に関与する可能性が高いことを示す。従って、活性中心に深く関与するこれらのアミノ酸残基を欠失したり、あるいは別のアミノ酸残基に置換した組み換え変異体トキシンでは、著しい立体構造変化を引き起こしやすく、トキシン活性だけでなく、免疫増強活性も同時に消失する可能性が高い。この推定を支持する例として、本発明者らは大腸菌易熱トキシンのN末端から112番目のグルタミン酸残基をリジン残基に置換した組み換え変異体では、トキシン活性が約1/2,860に低下するとともに、免疫増強活性も失われる事実を観察した (K. Komase et al., Vaccine 16, 248-254, 1998)。

このような事実に基づき、本発明者らは、上記3種類の官能基を持つアミノ酸残基の中から、アジュバント活性を支える重要なアミノ酸残基として、セリン残基、グルタミン酸残基、およびリジン残基の3種を選択した。これらのアミノ酸残基は、各種トキシンの活性をもたらす重要なアミノ酸残基として知られている。

以下に、これらのアミノ酸残基の置換によるトキシン活性の変化に関する報告をまとめる。トキシン活性を negative と表記した報告は、使用した測定条件では実質的に残存トキシン活性は検出されなかったものの、定量的な比較が行われていないものである。大腸菌易熱トキシンにおいては、アジュバント活性が認められているが免疫増強活性は十分なものではない。またコレラトキシン変異体においても、天然コレラトキシンと同じレベルの免疫増強活性を与えるためには天然コレラトキシンの10倍量が必要とされている。なおアミノ酸の置換について「他」と記載したものでは、この他のアミノ酸残基の置換が同時に行われている。このように、グルタミン酸残基やセリン残基は、しばしば置換の標的とされる重要なアミノ酸残基である一方で、その置換によってアジュバント活性を失う、あるいは減衰する報告が多い。

本発明においては、これらの置換の標的となった重要なアミノ酸残基に加え、塩基性のアミノ酸の代表として NH_2 基を持つリジン残基を加えて、アジュバント

活性を高度に維持するために必要なアミノ酸残基とした。リジン残基はトキシンの減毒化において重要な役割を持っている。たとえばホルマリン処理においては、リジンが持つ ϵNH_2 基にホルマリンがアタックし、ここにシッフの塩基を生成することによって立体構造の変化をもたらし、その結果として減毒化が成立するとされている。したがって、リジン残基を保持させることで、1/2000 以下という高度な減毒化を容易に達成することができる。

表 1

| トキシンの種類 | アミノ酸残基の置換 (文献) | トキシン活性の変化と アジュバント活性 | |
|-----------|---------------------|------------------------|----|
| | | | |
| 大腸菌易熱トキシン | 112 位 Glu→Lys (1) | Y: 1/2860 | — |
| | 63 位 Ser→Lys (2) | A: negative | + |
| コレラトキシン | 63 位 Ser→Lys (2) | A: negative | ± |
| | 61 位 Ser→Phe (3) | C:1/1000000 | ++ |
| | 112 位 Glu→Lys (4) | C:1/1000000 | ++ |
| 百日せきトキシン | 129 位 Glu→Gly 他 (5) | Y:1/1000000 | — |
| ジフテリア毒素 | 162 位 Glu→Lys 他 (6) | A: negative | — |

トキシン活性の指標 A: ADP-リボシル化酵素活性

C: CHO 細胞 spindle 形成試験

Y: Y-1 細胞変形試験

論文

(1) Komae et al., Vaccine 16,248-254,1998

(2) G.Douce et al., Infec.Immun.65,2821-2828,1997

- (3) S.Yamamoto Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 94, 5267-5272, 1997
- (4) S.Yamamoto J.Exp.Med.185, 1203-1210, 1997
- (5) M.Roberts et al., Infec.Immun.63, 2100-2108, 1995
- (6) T. Uchida et al., J.Biol.Chem.248, 3838-3844, 1973

1/2000 以下、あるいは 1/10000 以下という高度に減毒化したトキシンが高い免疫増強活性を有することは、先行文献から予想できないことである。たとえばコレラトキシンの主要なトキシン作用は、A サブユニットが担うとされている。そのトキシン活性は、A サブユニットの強い ADP-リボシル化酵素活性により、トキシンが進入した細胞内で cAMP 濃度バランスの破壊が起きることによって発現すると説明されている。大腸菌易熱トキシンも、同じ機序によりトキシン活性を発現する。大腸菌易熱トキシンの組み換え変異体において、ADP-リボシル化酵素活性とアジュバント活性との相関関係を解析した研究が報告されている。その結果、両活性は互いに密接に繋がっており、両者は分離不可能である、との見解が提出された(N.T.Lycke et al., Eur.J.Immunol.22, 2277-2281, 1992)。他の報告でも、酵素活性を低下させた組み換え変異体トキシンは、同時にアジュバント活性も低下することが報告された(例えば、J.D.Clements et al, Vaccine 6, 269-277, 1988、試験材料；大腸菌易熱トキシン。;W. J. Black et al., Science 240(4852), 656-659, 1988、試験材料；百日せき菌トキシン)。

すなわち従来の学説では、トキシン活性を大幅に低下させた場合、免疫増強活性もそれだけ低下するので、安全性の高いアジュバントの開発に繋がらないと考えられていたのである。ところが本発明の減毒化トキシンによって、トキシン活性が天然体の 1/2000 以下、例えば 1/10000 であっても、免疫増強活性は天然体と実質的に同等である場合があることが明らかとなった。このことは本発明者らの長年の研究により初めて明らかにされた新しい知見である。

減毒化トキシンにおいて、トキシン活性と免疫増強活性が分離される機構は現在明らかではない。

しかし、同様の現象として、トキソイドを抗原として用いる多くのワクチンに見られるとおり、減毒化トキシンが免疫原性を保持している場合が知られていることから、その機構をもとに考察する。たとえば減毒化コレラトキシンについては、以下のように考えられる。トキシン活性（たとえば ADP-リボシル化酵素;ADP-ribosyltransferase 活性）発現には、一定の大きさのオリゴペプチドが形成する特異な立体構造が必要なので、わずかの構造変化も活性の消失に繋がる。これに対し、免疫増強活性は、トキシン分子のままで、あるいはより小さいペプチドとして効果が発現する場合があります、トキシン蛋白質の一次構造のわずかな変化では、活性が保持される可能性がある。

コレラトキシンがアジュバントとして働く場合、種々の免疫増強反応を引き起こすことが知られている。例えば、(1) 抗原の透過性を促進する。受容体と結合して、ヘルパーT 細胞を活性化する。ヘルパーT 細胞の 1 型と 2 型の増殖を促進する。また、(2) 種々のサイトカイン類、例えば、インターフェロンガンマ、インターロイキン 1、4、5、12 などの産生を促進する。これらの免疫応答においては、(1)の場合にはトキシン分子がその構造を保持したまま効果を発揮し、一方、(2)の場合には、ペプチド断片に分解されて効果を発現する可能性が考えられる。しかし、この点に関して、詳細は十分には解明されていない。

抗原蛋白質は、プロテアソームの作用で一連のプロセッシングを受け、ペプチド断片となり、抗原提示細胞で提示され、これが刺激となり、その後の一連の免疫反応、例えば、ヘルパーT 細胞の活性化と増殖、種々のサイトカイン類の産生、さらに B 細胞による抗体生産などが引き起こされる。トキシンのアジュバント効果が発現される過程で、これと類似の機構が働く可能性が考えられる。

上記の可能性は、現段階では仮説であるが、トキシン活性は主に一つの機構に基づくのに対し、アジュバント活性は複数の機構により発揮されるので、減毒化トキシンにおいて、トキシン活性が消失しても、免疫増強活性は残る事が起こりうる、と考えられる。

(トキシン)

本発明によるアジュバントを構成する減毒化トキシンとは、細菌、真菌または動植物といった生物が生産する天然体トキシンの減毒化体である。本発明のアジュバントに利用されるトキシンとしては、特に細菌トキシンが望ましい。細菌トキシンは、大量生産が容易なことから経済的に有利であり、またたとえばコレラトキシンのようにアジュバント活性の点でも優れたトキシンを含んでいる。これらは単純蛋白質、または複合蛋白質である。すなわち本発明におけるトキシンとは、自然界の生物の生産する蛋白質性トキシン活性物質、その断片、サブユニットを意味する。なお、アジュバント活性を期待できない分子量が500以下の低分子トキシンは含まれない。また、有機合成化学により製造される化合物の一部に含まれる毒性物質（毒物）や有害重金属類についても、本発明によるトキシンを構成するものではない。

本発明における天然体トキシンとして次のものが例示される。

細菌トキシン：コレラトキシン、ジフテリアトキシン、百日せきトキシン、ブドウ球菌 α トキシン、ブドウ球菌 β トキシン、腸炎ビブリオ菌耐熱性溶血トキシン、病原性大腸菌易熱性トキシン、シガトキシン、および緑膿菌エンテロトキシン A など

真菌トキシン：カンジトキシン、フミガトキシン、および茸類のトキシンなど

植物トキシン：リシンなど

動物トキシン：蛇毒、蜂毒、節足動物トキシン（例えばサソリ毒）など

トキシンは色素、抗生物質などと同じく、いわゆる、二次代謝産物である。トキシン生産性の微生物や動植物における本来の生理的役割は必ずしも明白でない場合が多い。二次代謝産物生産の特徴として、トキシン生産能は菌株（動植物においては個体）特異的であり、その種属の生物ならどの個体も生産する訳ではない。同一の種の菌株が同一のトキシンを生産する頻度はトキシンにより一定しない。同一のトキシンが亜種、近縁種によっても生産される。野生株でも近縁種で

も、人工変異株でも、生産されるトキシンは、構造が部分的に少しずつ変化した多成分のトキシンを生産する場合が多い。本発明のアジュバントに複数種のトキシン混合物を使用することもできる。また、トキシン分子がいくつかのサブユニットで構成される場合、本発明のアジュバントにはアジュバント活性に必要なサブユニットのみを単独で、あるいは複数のサブユニットを選択して利用することもできる。サブユニットで構成されるトキシンとして、コレラトキシン、百日せきトキシン、ジフテリアトキシン、病原性大腸菌易熱性トキシン、およびカンジトキシンなどが例示される。トキシンを構成するサブユニットは、一般にサブユニット単位でもアジュバント活性を示す（特開平 2-243633 号）。したがって、本発明のトキシンはそれらのサブユニットであることもできる。

更に本発明のアジュバントを構成するトキシンとして、天然体トキシンのアミノ酸配列や、糖鎖に代表されるその他の構造を改変した変異体を用いることもできる。変異体トキシンは、トキシン生産性野生株または近縁種を変異誘起剤で処理して作成された人工変異株によって生産される。この場合を人工変異体トキシンと記載する。変異体トキシンはまた遺伝子組み換え技術を利用して変異体トキシン生産能を付与された組み換え細胞生物によっても生産される。後者の場合を組み換え変異体トキシンと記載する。

変異体トキシンは天然体分子構造の一部分が変化しているので、トキシン分子の構造変化に伴い、通常、トキシンの特性の一部を失う。しかし一方で免疫増強活性を保持する場合もありえる。変異体トキシンのトキシン活性が十分に低く、天然体の 1/2000 以下であれば、免疫増強活性を確認後、そのまま減毒化トキシンとして本発明のアジュバントに利用できる。また、そうでない場合、変異体トキシンを上記の方法で化学的または物理的処理により、さらに減毒化することによってアジュバントとして利用することができるようになる。変異体トキシンは、それを含むワクチンの使用条件下で、安定であるものが望ましい。またトキシン活性が復活しにくいものが望ましい。トキシン活性の復活とは、様々な処理によ

って大幅に低下したトキシン活性が、処理後の時間経過に伴って回復する現象を指す。

人工変異体トキシンにおける構造変化の部分は、保持すべきアミノ酸残基として特定した3アミノ酸残基を除けば、その変異体がアジュバント活性を有する限り特に限定されない。例えば、トキシン分子を構成するオリゴペプチド部分のアミノ酸残基、オリゴ糖部分の糖残基、あるいは有機酸部分などの一カ所、あるいは複数の変化が例示される。

人工変異体においては、変異するアミノ酸残基、あるいは糖残基を人為的に選択することができないから、通常は変異の内容をあらかじめ規定することは困難である。しかし、研究の過程においては、トキシン活性の低下や免疫増強活性は容易に確認することができるので、本発明の目的に合う変異体を得ることができる。また、予想外のアミノ酸残基が変化した変異体を見いだせるという利点がある。

一方、組み換え変異体トキシンの場合には、変異するアミノ酸残基、あるいは糖残基を選択し、目的とする変異を人為的に導入することができる。具体的には、トキシン分子を構成するオリゴペプチド部分のアミノ酸残基、オリゴ糖部分の糖残基、あるいは有機酸部分などの一カ所、あるいは二カ所以上の変異が例示される。免疫増強活性発現にとって重要なペプチド断片を含むオリゴペプチド断片も本発明のアジュバントに含まれる。

天然体トキシンおよび変異体トキシンの製造

天然体トキシンは、野生株の生産物として取得できる。または高力価生産性変異株など種々の人工変異株の生産物として取得できる。あるいは、遺伝子操作により野生株などの遺伝子を組み込んだ同種または異種の組み換え生物細胞の生産物として取得できる。更には合成化学的手段により製造することもできる。

本発明に用いる細菌トキシンは、例えば、トキシン生産性細菌の培養物を原料

として公知の方法を組み合わせ、抽出、分離、精製し、製造することができる。コレラトキシンについて例示すれば次のとおりである。トキシン生産性コレラ菌 (*Vibrio cholerae*) を 36°C で 18 時間培養する。培養液を種菌として寒天培地上、または、液体培地で大量培養する。培養後、培養上清（液体培養の場合）を硫酸沈殿、または限外濾過で濃縮する。この後、セファデックスなどを用いる公知のカラムクロマトグラフィー法、超遠心法、ゲル電気泳動法などを組み合わせてトキシンを精製する。培養中並びに精製途中の試料のトキシン活性は後述の方法により測定する。

また、百日せきトキシンについて例示すれば次のとおりである。百日せき菌 (*Bordetella pertussis*) 東浜株 I 相菌を Bordet-Gengou 培地で種培養し、これを Cohen-Wheeler 培地に移植し、48 時間培養し、その培養上清を出発原料として用いる。培養上清をヒドロキシアパタイトカラムにアプライし、0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で洗浄し、ついで 0.5 M NaCl 添加 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で溶出する。さらに、CM-セファロースや適当なアフィニティーリガンドを結合した担体を用いるカラムクロマトグラフィーにより精製する。培養中並びに精製途中の試料のトキシン活性は公知の方法により測定する。

この他、茸の産生するトキシンでは、自生、または栽培された茸から抽出、精製することができる。動物の産生するトキシンの製造方法は、トキシン生産性動物、例えば、蛇を飼育し、口顎部分のトキシン産生器官から採取する。もちろん既にトキシンが市販されている場合には、トキシン製造メーカから購入することもできる。トキシン生産工程とトキシンの品質は、当該生物製剤基準と関連法規に従うかぎり、種々変更することができる。

人工変異体トキシンは、トキシン生産性野生株から誘導される人工変異株により生産される。人工変異株は野生株を変異誘起剤などで処理して作成される。変異誘起処理方法としては、N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine、nitrosourea、nitrogen mustard などの化学薬品による処理、および紫外線照射、コバルト 60

などによる放射線照射、加温などの物理化学的処理などが公知である。人工変異株の培養法、トキシンの精製法、活性確認法などは、野生株の場合に準じる。

組み換え変異体トキシンは組み換え細胞生物によっても生産される。その為の方法は、公知である。大腸菌易熱トキシンの組み換え変異体の製造方法を例示する。患者分離の易熱トキシン生産株 (*Escherichia coli* 1032 株) から、例えば田村らの方法 (S. Tamura et al., Vaccine 12, 1083-1089, 1994) により高力価トキシン生産性組み換え株を作成する。まず、易熱トキシンと耐熱トキシンの両方の遺伝子をコードするプラスミド (65kbp) を分離する。プラスミドから制限酵素処理などにより易熱トキシン遺伝子 (6.7kbp) を切り出し、pBR322 などのプラスミドに連結する。PCR 法などで増幅した後、易熱トキシン遺伝子を別の発現ベクターに連結する。次に、Ho らの方法 (S.N.Ho et al., Gene 77, 51-59, 1989) などにより、このベクター上で位置特異的変異処理を行い、続いて選択的プライマーを用いて PCR 法で増幅し、組み換え変異体トキシンを生産する組み換え大腸菌の菌株を作成する。つぎに Clements らの方法 (J.D. Clements et al., Infect. Immun. 24, 760-769, 1979) に従って培養し、培養液から限外濾過、硫酸アンモニウム沈殿、アガロースゲルクロマトグラフィー (ガラクトース添加緩衝液で溶出) などにより目的とする蛋白質精製し、ヒト型大腸菌易熱トキシンの組み換え変異体トキシンを得ることができる。あるいは、前記プロセス中で位置特異的変異処理を行わなければ、天然体トキシンを得ることができる。

たとえば上記のとおり、位置特異的変異処理法などを応用すれば、トキシンのアミノ酸配列のなかで、任意の部位のアミノ酸残基を別の残基に変化させることも可能となっている。逆に、特定の部位の特定のアミノ酸残基、たとえばグルタミン酸残基を変化させないで保持することが可能である。糖残基についても基本的に同様である。得られた変異体の中から、アジュバント活性を維持しうるものを選択し本発明のトキシン変異体とする。なお、この変異体の持つトキシン活性については、任意のレベルにあることができる。すなわち、アジュバント活性の

みならず、トキシン活性について天然のものと同等の水準に有れば、天然のものと同様に適当な減毒化処理を施してアジュバントとすることができる。あるいは、もしもアジュバント活性を持ちながらトキシン活性の低い望ましい変異体を得ることができれば、そのまま、若しくは若干の減毒化処理の後に減毒化トキシンとしてアジュバントに利用することができる。変異体を得るには、いくつかの思考錯誤的な実験が必要となるが、反面得られた組み換え変異体トキシンは、一般的に、トキシン活性が復帰しにくい利点がある。

トキシンの減毒化方法

野生株、人工変異株、あるいは組み換え変異株が生産するトキシンは、減毒化の後に、免疫増強活性があることを確認し、本発明のアジュバントとする。トキシンの減毒化方法は公知の方法を使用できる。減毒化方法を例示すれば次のとおりである。本発明における減毒化とは、なんらかの手段によりトキシン活性を減ずることを意味し、ここに例示する方法に限定されるものではない。しかし、これらの方法は簡便で確実な処理効果を期待できる有利な方法である。

これらの減毒化方法はいずれもトキシイド化等に利用されている公知の手法である。しかし本発明においては 1/2000 以下という高度な減毒化が必要である。したがって、公知の手法と同様の原理に基づくものの、より過酷な条件が求められる。具体的には、たとえばコレラトキシンのホルマリン処理の場合、処理温度は 5°C-30°C (通常は 5°C)、ホルマリン濃度を 0.5%-0.8% (通常は 0.3%)、そして処理日数を 20-70 日 (やはり通常は 7-14 日程度) 等が例示される。

[1] 化学的方法

トキシンを適当な濃度で緩衝液に溶解し、トキシンが安定な範囲 (通常 pH5-8) に pH を調節しながら、適当な濃度 (通常 0.01-1.0%) の処理薬剤たとえば、ホルマリン、グルタルアルデヒド、フェノール、沃素、酸無水物、胆汁酸等の界面活

性作用物質などを徐々に加え、適温（例えば 5℃）で保温処理する。処理後、透析など公知の方法により、処理薬剤を除去し、残存トキシン活性を測定する。必要に応じて、減毒化トキシンの使用温度、例えば 37℃で再度保温し、トキシン活性が復帰しないことを確認する。こうして、減毒化トキシンが得られる。この方法は、従来から広く実施されてきたトキシソイド化の方法に準じるものであり、大量の製造にも適している。しかし、トキシン活性が復帰しないような処理方法が望ましい。その為の方法として、減毒化処理剤、例えばホルマリンの濃度に見合う量のリジンを同時に添加する方法、あるいは、減毒化処理後、還元処理をする方法などが公知である。

〔2〕物理的方法

トキシンを適当な濃度で緩衝液に溶解し、酸性 pH（例えば pH2-4）、アルカリ pH（例えば pH8-11）など、トキシン活性が通常失われる pH に調節しながら、所定の適温で保温処理する。または、トキシン活性が通常失われる温度（例えば 40℃以上）に調節しながら、保温処理する。あるいは、所定の適当な波長の音波、電磁波などの照射処理をする。処理途中と処理後、試料の残存トキシン活性を測定する。必要に応じて、減毒化トキシンを適当な温度、例えば 37℃で再度保温し、トキシン活性が復帰しないことを確認する。免疫増強活性があることを確認し、減毒化トキシンを得ることができる。なお、化学的な処理と物理的な処理とは、適宜組み合わせる用いることができる。

残存トキシン活性の確認方法

残存トキシン活性の測定は、公知の方法による（例えば、国立予防衛生研究所学友会編集、”ワクチンハンドブック”、丸善、1994 年。村田良介他編集”蛋白毒素”上巻、下巻、講談社サイエンティフィック、1972 年 など）。その方法を分類すれば、酵素活性測定法、動物細胞の生理的応答測定法、実験動物の生理的

応答測定法、あるいは実験動物の生死判定法、などに分けられる。具体的な測定方法はトキシンにより異なるが、たとえば以下のような指標を例示することができる。これらの指標の具体的な測定方法は公知である。なお、トキシン活性の比較をこれらの指標に限定するものではないが、減毒化前後のトキシン活性の比較は同じ指標に基づいて行うべきであることは言うまでも無い。

(細菌トキシン)

コレラトキシン、病原性大腸菌易熱性トキシン

ADP-リボシル化酵素活性

cAMP の蓄積

Y-1 細胞の変形

マウスの体重減少

CHO 細胞の伸長

百日せきトキシン

ADP-リボシル化酵素活性

CHO 細胞の伸長

白血球増多活性

ヒスタミン増感活性

マウスの体重減少

CHO 細胞の伸長

ジフテリアトキシン

ADP-リボシル化酵素活性

モルモットの生存

ウサギ皮膚感作活性

破傷風トキシン

ADP-リボシル化酵素活性

モルモットの死亡

ウサギ皮膚感作活性

ブドウ球菌 α トキシン、ブドウ球菌 β トキシン

溶血活性

シガトキシン

溶血活性

緑膿菌エンテロトキシン A

ADP-リボシル化酵素活性

腸炎ビブリオ菌耐熱性溶血トキシン

ADP-リボシル化酵素活性

溶血活性

(真菌トキシン)

カンジトキシン、フミガトキシン、

マウス死亡活性

(動物トキシン)

蛇毒

コリンエステラーゼ活性

コリンエステラーゼ阻害活性

ホスホリパーゼ A2 活性

血液凝固活性

血小板凝集活性

抗補体活性

蜂毒

N-アセチルグルコサミニダーゼ活性

ヒアルロニダーゼ活性

トキシン活性の測定にあたっては、ある測定方法で残存トキシン活性が認めら

れなくとも、別の方法では異なった結果となるケースもある。例えば、減毒化コレラトキシンの残存活性を ADP-リボシル化酵素活性で測定した結果で実質的にゼロであっても、Y-1 細胞形態変化法ではトキシン活性を検出した例がある（例えば K. Komase et al., Vaccine 16, 248-254, 1998）。また、大腸菌易熱トキシンの N 末端から 7 番目をリジン残基に置換した組み換え変異体では、ADP-リボシル化酵素活性は実質的にゼロであったが下痢惹起性を認めた例がある。すなわち、大腸菌易熱トキシンのトキシン活性は ADP-リボシル化酵素活性で代表されるが、別の機構による小さな第二のトキシン活性があり、組み換え変異体において第一の活性が著しく低くなった後には、第二のトキシン活性が相対的に大きくなるので検出されるようになると考えられる。一般的に、生細胞や生体を用いる測定方法ではトキシン活性がより鋭敏に検出される傾向がある。この背景には、上記の機構があると推定される。

したがって、トキシン活性の比較は生細胞や生体の応答に基づいた鋭敏な方法で行うのが一般的にはより確実である。また残存トキシン活性は複数の測定方法により評価することが望ましい。本出願の実施例では、コレラトキシンの残存トキシン活性を、受容体結合活性法、Y-1 細胞形態変化法、マウス足腫脹法、およびマウス腹腔内投与法などを併用して評価した。また抗トキシン抗体を利用する酵素免疫測定法（ELISA）も、トキシン活性の指標として有用である。いずれにせよ、原則としてそのトキシンの活性を鋭敏に反映する指標に基づいて、1/2000 以下のトキシン活性となるように処理することが重要である。

上記減毒化トキシンに保存剤や安定剤、あるいは更に公知のアジュバントを組み合わせて本発明によるアジュバントが構成される。アジュバントの安全性は、一般に繰り返し測定することによって判定される。また安全性の評価にあたっては、その指標の一つに生物細胞や生体を用いる測定方法を採用することが望ましい。これらの方法に加えて、実験動物に投与して急性毒性を調べるような一般的な安全性試験法を併用する事は言うまでも無い。また経口投与、経皮投与および

経鼻投与における安全性の指標として皮膚刺激性や粘膜刺激性に問題のない事を確認することも重要である。

アジュバント活性

本発明においては、減毒化処理によってトキシン活性を 1/2000 以下とする一方で、アジュバント活性を保持した減毒化トキシンをアジュバントとして利用する。前記〔1〕において規定した保持すべき3種のアミノ酸残基を備えたトキシンを利用すれば、アジュバント効果を高く維持できる可能性が高い。しかし、トキシン活性の低下のための処理を通じて、アジュバント活性が低下していないかどうかは、常に確認する必要がある。アジュバント活性は、活性を比較すべき物質を免疫抗原とともに動物に免疫し、免疫抗原に対する抗体価の上昇を観察することによって確認することができる。免疫動物の系統や免疫抗原などの条件を統一して比較すれば、アジュバント活性を比較することができる。

使用形態

本発明の減毒化トキシンをワクチンの有効成分として用いる使用形態は特に限定されない。すなわち、公知の種々の適切な使用形態に適用することができる。たとえば物理的混合や抗原蛋白質との化学的結合物とすることができる。また、リポソームなどのキャリアーにワクチンとともに内包させることも可能である。

本発明の減毒化トキシンは公知のアジュバントの1つ以上と同時に使用することができる。実施例5には本発明の減毒化コレラトキシンと公知のアジュバントの一つ大腸菌易熱性トキシン B サブユニットとの混合使用の例を示した。減毒化トキシンアジュバントは大腸菌易熱トキシン B サブユニットとの混合使用においても粘膜免疫活性を誘発し、しかも、相乗効果が認められた。当業者ならば公知の方法を用いる試行実験により、好適な組み合わせを見い出すことができる。その結果、抗原の量を低下させたり、もう一方のアジュバントの量を低下させ、

望ましくない副反応を低下させ、望ましい免疫反応を増強することができる。

ワクチン

本発明によるアジュバントに基づいて、新規なワクチン製剤が提供される。本発明のワクチン製剤は、アジュバントと免疫抗原とからなり、狭義及び広義のワクチンを含む。すなわち、1) ヒト及び動物に感染するウイルス、細菌、真菌、原虫、その他の微生物に有効な狭義のワクチンを含む。その一部を例示すれば、インフルエンザワクチン、百日せきワクチン、精製百日せきジフテリア破傷風混合ワクチン、日本脳炎ワクチン、A型肝炎ワクチン、B型肝炎ワクチン、ロタワクチン、麻しんワクチン、風しんワクチン、おたふくかぜワクチン、麻しん風しんおたふくかぜ三種混合ワクチン、麻しん風しん二種混合ワクチン及びヘモフィルスインフルエンザワクチン等の各種ワクチンが挙げられる。さらには、結核ワクチン、多剤耐性黄色ブドウ状球菌 (MRSA) ワクチン、ヘリコバクター・ピロリワクチン、出血性大腸菌 (EHEC) ワクチン、サルモネラワクチン、クラミジアワクチン、マイコプラズマワクチン、エイズワクチン、マラリアワクチン、コクシジウムワクチン、あるいは住血吸虫ワクチンを含む。2) さらに広義のワクチンとして、がんワクチン、不妊ワクチン、胃潰瘍ワクチン、糖尿病ワクチン及び動脈硬化症ワクチンなど非感染症の予防や治療に有効なワクチンを含む。ワクチンの接種方法としては注射、経口、経皮、経鼻、その他の方法が可能である。

これらのワクチンは製造方法により分類される種々のワクチンを含む。すなわち、弱毒化生ワクチン、不活化ワクチン、コンポーネントワクチン、DNAに基づくワクチンなどを含む。DNAに基づくワクチンの中には、プラスミドなどのキャリアーに組み込んだ DNA 断片を含むワクチンのほか、リボザイムやアンチセンスオリゴヌクレオチドなどを併用するワクチンが含まれる。これらのワクチンは、治療用、あるいは予防用に用いられる。また、ワクチンの効果にとって有効な抗原成分を遺伝子操作技術を応用して組み換え生物細胞に生産させたものを用

いる組み換えワクチンも含まれる。これらのワクチンは単味ワクチンでも混合ワクチンでも良い。これらのワクチンの製造方法や使用形態を例示すれば次の通りである。

- ・ インフルエンザワクチン；発育鶏卵、または、ベロ細胞など動物細胞培養技術により増殖させたウイルスをエーテル、界面活性化剤などで分解精製して得た、あるいは遺伝子操作や化学合成によって得た赤血球凝集素 (HA)、ノイラミニダーゼ (NA)、核蛋白質 (NP)、マトリックス蛋白質 (M) あるいはその一部などを含む注射用、または経口、経皮、経鼻用のスプリットワクチン。または、これらの蛋白質の遺伝子を含む DNA 断片をふくむ経鼻接種用 DNA ワクチン。
- ・ 百日せきワクチン；百日せき菌を培養した培養液あるいは菌体より塩析、超遠心分離などを用いて抽出し、ホルマリンで無毒化した不活化ワクチン、または、遺伝子操作や化学合成によって得た百日せき菌毒素 (PT)、赤血球凝集素 (FHA)、69K 膜蛋白質、あるいは、その一部などを含む組み換えワクチン。
- ・ 百日せきジフテリア破傷風混合ワクチン；百日せきワクチンにジフテリアトキシソイドおよび破傷風トキシソイドを混合した注射用、または経口、経皮、経鼻用の三種混合ワクチン。
- ・ 日本脳炎ワクチン；マウス脳内で増殖したウイルス、またはベロ細胞など動物細胞培養技術により増殖したウイルスを超遠心分離あるいはエチルアルコールなどを用いてウイルス粒子を精製した後、ホルマリンで不活性化したもの、あるいは遺伝子操作や化学合成などによって得た抗原蛋白質を含むワクチン。
- ・ B 型肝炎ワクチン；B 型肝炎キャリアの血液を原材料とし、塩析、超遠心分離を用いて HBs 抗原を分離精製したプラズマワクチン、あるいは遺伝子操作や化学合成などによって得た抗原部位などを含む組み換えワクチン。
- ・ 麻疹ワクチン；ニワトリ胎児細胞などの培養細胞、あるいは、発育鶏卵で増殖させた弱毒ウイルス生ワクチン、あるいは、ウイルスの一部、または、遺伝

子操作や化学合成によって得た感染防御抗原を含む組み換えワクチン。

- ・ 風しんワクチン；ニワトリ胎児細胞などの培養細胞、あるいは、発育鶏卵で増殖させたウイルス、あるいは、その一部、または、遺伝子操作や化学合成によって得た感染防御抗原を含むワクチン。

- ・ おたふくかぜワクチン；家兎細胞などの培養細胞あるいは発育鶏卵で増殖させたウイルス、または、その一部、あるいは、遺伝子操作や化学合成によって得た感染防御抗原を含む弱毒生ワクチン。

- ・ 麻しん風しんおたふくかぜ混合ワクチン；麻しんワクチン、風しんワクチン、おたふくかぜワクチンを混合した三種混合ワクチン。

- ・ 麻しん風しん混合ワクチン；麻しんワクチン、風しんワクチンを混合した二種混合ワクチン。

- ・ ロタワクチン；MA104 細胞など培養細胞で増殖させたウイルス、または患者の糞便中より得たウイルス、または、その一部、あるいは遺伝子操作や化学合成により得た感染防御抗原を含むワクチン。

- ・ マイコプラズマワクチン；マイコプラズマ増殖用培地で増殖したマイコプラズマ、または、その一部、あるいは、遺伝子操作や化学合成などにより得られた感染防御抗原を含むワクチン。

- ・ エイズワクチン；培養細胞で増殖させたウイルスまたは患者より得たウイルス、または、その一部、あるいは遺伝子操作や化学合成により得た感染防御抗原を含むワクチン、あるいは有効な DNA 断片を含む DNA ワクチン。

- ・ H.ピロリワクチン；培養した H.ピロリ菌体の破砕物、または、H.ピロリ培養物から分離したウレアーゼ、熱ショック蛋白質、毒素などを抗原とするワクチン、あるいは、遺伝子組み換え技術により生産されたこれらの抗原蛋白質からなる注射用あるいは経口、経皮および経鼻接種用ワクチン。

ワクチンの性状

上記ワクチンは液状または粉末状で提供される。

これらワクチンは本発明の減毒化トキシンと共に投与されるときは液状の方が鼻腔内投与（鼻腔内スプレー、滴下、塗布など）や注射の場合に適している場合が多い。更に鼻腔内投与の場合は、粉末スプレー方式も可能である。また、本発明によるワクチン製剤には、公知の安定剤や防腐剤を配合する事ができる。安定剤としては、0.2%程度のゲラチンやデキストラン、0.1-1.0%のグルタミン酸ナトリウム、あるいは約5%の乳糖や約2%のソルビトールなどが用いられる。防腐剤としては、0.01%程度のチメロサルや0.5%程度のフェノキシエタノール、0.1%程度のベータプロピノラク톤などが公知である。

減毒化トキシンの混合比率

本発明によるワクチンにおける抗原と減毒化トキシンの混合比率として、1:0.0001～1:10000（重量比）を例示できる。この範囲は一般的な範囲であり、ワクチンの種類に応じて好適な比率を決定して用いる。その為に必要な方法は、当業者に公知である。実施例に示した天然トキシンの減毒化体を含む本発明によるアジュバントは、天然体と同じ使用量で同レベルの免疫増強活性を示す。一方、公知の組み換え変異体では、天然トキシンと同レベルの免疫増強活性を達成するためにより多くの接種が必要となることが多い。

減毒化トキシンの混合法

本発明のワクチン製剤は、上記ワクチンに本発明の減毒化トキシンアジュバントを所定の量比で混合することにより調製される。調製は厳密に無菌的に行なうべきである。それぞれの原材料も無菌的に調製される。ワクチン作用以外に必要なのないパイロジェンやアレルゲンとなるような夾雑蛋白質は可能な限り除去しておくことが望まれる。当業者にとって、その為に必要な方法は公知である。本発明のワクチン製剤は、ワクチン抗原と本発明の減毒化トキシンをそれぞれ別々に

調製、製剤化しておき、用時に混合してから接種するか、または、別々に、ほぼ同時に投与するという方法によっても、効果を発揮させることができる。

ワクチン接種法

本発明によるワクチンの使用方法は公知のどの方法も使用できる。

接種量はマウスの場合、鼻腔内で $5\mu\text{L}$ ～ $50\mu\text{L}$ 、ヒトの場合は鼻腔内投与、注射いずれの場合も $0.1\sim 1.0\text{mL}$ が好適である。経皮接種では、ワクチン組成物を担体に保持させ、皮膚に接触させることによって接種が行われる。ワクチン組成物における抗原蛋白質の量は、一般に 1 投与あたり $0.1\text{ ng}\sim 100\text{ mg}$ 、望ましくは $1\mu\text{g}\sim 1\text{ mg}$ 程度である。一方、アジュバントは、用いられる免疫抗原の種類や使用量に応じて、適切な配合量が決定される。ワクチン組成物を保持させる担体には、リント布のような吸収性の担体や、あるいは軟膏やスプレーとして塗布するための公知の担体を用いることができる。

次に例示するワクチンは、効果の点で、あるいは、接種操作の点で、経口接種、経皮接種あるいは経鼻接種が強く要望されている。すなわち、インフルエンザワクチン、百日せきワクチン、ジフテリアワクチン、ロタワクチン、麻しんワクチン、風しんワクチン、おたふくかぜワクチン、ヘリコバクター・ピロリワクチン、出血性大腸菌（EHEC）ワクチン、クラミジアワクチン、マイコプラズマワクチン、コクシジウムワクチン、エイズワクチン、マラリアワクチン、および住血吸虫ワクチン等ではこれらの接種方法が望まれている。

これらのワクチンは、単独で接種される場合もあるし、百日せき・ジフテリア・破傷風三種混合ワクチン、あるいは、麻疹・風疹・二種混合ワクチンのように、複数のワクチンを混合して、同時に接種する方法を採用することもできる。経口接種、経鼻接種が望まれる理由は、一つは、気道や消化管の粘膜が感染初期の重要な部位であるためである。適切な免疫増強活性の強いアジュバントを含むワクチンの接種により、局所粘膜における免疫機構を誘発し、できるだけ感染初期に

防御効果を発揮させることが可能になる。あるいは、マラリアワクチンのように、必ずしも十分な医療施設の期待できない地域で使用される機会が多いことが予想されるワクチンについては、医師や看護婦など専門の医療技術者の助けが無くても接種が可能な接種方法として、経口接種、経皮接種および経鼻接種などが望まれるからである。さらに経皮接種が望まれる理由として、副作用等が発生した際、必要に応じてワクチン接種を中断できることなどが挙げられる。

図面の簡単な説明

図1は、減毒化コレラトキシンのガングリオシド GM1 への結合能を示すグラフである。

コレラトキシンをホルマリン処理により減毒化し、本発明のアジュバントを製造する途中に実施した、減毒化確認試験例を示す。図中、縦軸は、受容体であるガングリオシド GM1 への結合能 (ELISA の OD/410 nm) を、横軸は、トキシン濃度 (ng/mL) を示す。

図2は、二次応答による鼻腔粘膜における抗インフルエンザウイルス抗体産生に対する減毒化コレラトキシンの増強作用を示すグラフである。

本発明のワクチン製剤のうち、ワクチンとしてインフルエンザワクチンを用いたものを経鼻接種した時の鼻腔洗液中の抗体価を示す。縦軸は種々の条件で処理した減毒化コレラトキシンを示し、横軸は鼻腔洗液中の抗 HA IgA 抗体濃度 (μ g/mL) を示す。

図3は、二次応答による血清中の抗インフルエンザウイルス抗体産生に対する減毒化コレラトキシンの増強作用を示すグラフである。

本発明のワクチン製剤のうち、ワクチンとしてインフルエンザワクチンを用いたものを経鼻接種した時の血清中の抗体価を示す。縦軸は種々の条件で処理した減毒化コレラトキシンを示し、横軸は血清中の抗 HA IgG 抗体濃度 (μ g/mL) を示す。

図4は、減毒化トキシンの免疫増強活性を示すグラフである。

残存トキシン活性が異なるコレラトキシンをアジュバントとして含む本発明のインフルエンザワクチンを経鼻接種し、二次応答における鼻腔洗液中、または血清中の抗体価を示す。縦軸は、天然コレラトキシンを用いた対照区の抗 HA IgA 抗体価に対する、減毒化コレラトキシンを用いた試験区の鼻腔洗液中の抗 HA IgA 抗体価の相対値 (■) および、天然コレラトキシンを用いた対照区の抗 HA IgG 抗体価に対する、減毒化コレラトキシンを用いた試験区の血清中の抗 HA IgG 抗体価の相対値 (○) を示し、横軸は天然トキシンの活性に対する、試験に使用した減毒化コレラトキシンの残存トキシン活性の相対値 (Y-1 細胞形態変化法で測定) を示す。

図5は、二つのアジュバントの相乗効果を示すグラフである。

アジュバントとして、本発明の減毒化コレラトキシンおよび公知の大腸菌易熱トキシン B サブユニットを併用し、これらを含むインフルエンザワクチンを経鼻接種したときの免疫応答を示す。縦軸は試験に使用したアジュバントの種類と量を示し、横軸は免疫応答をマウス足腫脹法で測定した結果を示す。

発明を実施するための最良の形態

以下本発明の実施例を示すが、本発明は何らこれらに限定されるものではない。

実施例 1 コレラトキシンの調製

コレラトキシンは Finkelstein らの方法 (R. A. Finkelstein et al. J. Infect. Dis., 121, Suppl., S63, 1970) に準じて製造した。

トキシン生産性コレラ菌 (*Vibrio cholerae* 稲葉型 569B 株) を Finkelstein らの半合成カザミノ酸培地 (グルコース添加液体培地) で 30°C、20 時間培養した。培養後、培養上清をコレラトキシン分子 (分子量 8.6 万) の通過する限外濾過膜を通過させた。通過液に少量の水酸化アルミニウムゲルを加えてトキシンを吸着させ、遠心により集めた。30-35°C に加温しながら、10%リン酸-10%クエン酸塩 (pH

7.6)で溶出し、溶出液を 0.1M クエン酸塩水溶液に対して透析した。その後、DEAE-セファデックスのカラムに通塔し、0.1-0.2M 食塩水添加リン酸緩衝液（以下 PBS と省略する）で溶出した。次にセファデックス G-75 のカラムに通塔し、PBS で溶出した。得られた試料をゲル電気泳動法により調べた結果、コレラトキシンだけの染色帯が観察された。純度は約 95%であった。収量は培養液 100L から 250mg であった。

実施例 2 コレラトキシンの減毒化

実施例 1 で得た精製コレラトキシンを 0.01M 生理食塩水添加 PBS(pH7~8)に溶解した。ここに 0.05M のリジンを加え、その後、終濃度で 0.1、0.3、0.5、0.6、0.8、および 1.0%となるように、ホルマリンを滴下し、30-40°Cでそれぞれ 7-96 日間保温した。保温の途中で試料を採取し、採取した試料をただちに 20 倍量の PBS に対して透析し、ホルマリンを除去した。その後、濾過除菌し、減毒化コレラトキシンを得た。途中採取した試料の一部を用い、途中経過を確認した。一例として、ホルマリン処理 12 日目の試料について、コレラトキシン B サブユニットの受容体であるガングリオシド GM1 への結合能（トキシンの標的細胞に対する結合機能を持つサブユニット、トキシン活性は A サブユニットによりもたらされている）を測定する方法により残存トキシン活性を測定した結果を図 1 に示す。この結果から、0.3%、または 0.5%のホルマリンで 12 日間処理したばあいに、ガングリオシド GM1 への結合能はそれぞれ、天然体の約 1/15、1/100 に低下することがわかる。

種々の条件で減毒化処理を行った各種試料の残存トキシン活性を Y-1 細胞形態変化法で測定した。その結果の一例を表 2 に示す。この結果から、0.3%および 0.5%ホルマリンで 12~96 日間処理した場合、残存トキシン活性は 1/1780~1/114000 に低下することが分かる。上記のように調製した減毒化コレラトキシンを用い、マウスにおける急性毒性を調べた。表 2 に記載の残存トキシン活性が 1/7000 以下

の減毒化コレラトキシンは、いずれも 30 mg/kg の腹腔内投与において毒性の兆候は認められなかった。したがって、35°C、0.3%ホルマリン処理であれば、12 日以上の処理でトキシン活性 1/2000 以下（マウス急性毒性を指標とする）とすることができる。

表 2

ホルマリン処理コレラトキシンの残存トキシン活性
(Y-1 細胞形態変化法で測定した結果による)

| ホルマリン処理 | | 残存毒性 (ED50) | | 減毒率 |
|---------|-------|----------------------|-------------------|---------|
| 濃度 (%) | 処理 日数 | 希釈 (4 ⁿ) | (4 ⁿ) | 減毒倍率概数 |
| 0.3 | 1 2 | 2.0 ± 0.6 | 6.7 | 10,800 |
| | 2 4 | 2.3 ± 0.6 | 6.4 | 7,130 |
| | 4 8 | 2.7 ± 0.6 | 6.0 | 4,100 |
| | 7 2 | 3.3 ± 0.6 | 5.4 | 1,780 |
| | 9 6 | 3.3 ± 0.6 | 5.4 | 1,780 |
| 0.5 | 1 2 | 0.3 ± 0.6 | 8.4 | 114,000 |
| | 2 4 | 0.7 ± 0.6 | 8.4 | 65,500 |
| | 4 8 | 1.3 ± 0.6 | 7.4 | 28,500 |
| | 7 2 | 1.3 ± 0.6 | 7.4 | 28,500 |
| | 9 6 | 0.7 ± 0.6 | 8.0 | 65,500 |
| 未処理対照 | | 8.7 ± 0.6 | | 1 |

実施例 3 インフルエンザ HA ワクチンに対する二次抗体産生増強作用

マウスに馴化したインフルエンザウイルス PR8 株 (A/プエルトリコ/8/34、H1N1 型) から調製した HA 抗原をワクチン用の抗原として用いた。アジュバントには減毒化コレラトキシンを用いた。用いた減毒化コレラトキシンの残存トキシン活性は、1/1780～1/114000 (Y-1 細胞形態法による) であった。BALB/C マウス (6 週

令、雌)を一群5匹で試験に用いた。マウスをアモバルビタルナトリウムを腹腔内投与して麻酔した。1 μ gのワクチン抗原と1 μ gのアジュバントを含むように調製した生理的食塩水添加PBS10 μ Lをマウスの片方の鼻孔より滴下し、経鼻免疫した。4週間後さらに同じ条件で二次免疫した。二次免疫の2週間後、マウスの血清と鼻腔洗液を採取した。

血清中の抗インフルエンザウイルス抗体価はHI抗体価により測定した。鼻腔洗液は、放血後のマウスの左右の鼻腔より1mLの0.1%牛血清アルブミン(BSA)を含むPBSを灌流することによって回収した。鼻腔洗浄液中のHA-IgA抗体量、および血清中の抗HA-IgG抗体量は酵素免疫測定法(ELISA)によって測定した。抗HA-IgAの定量の際には、コーティング緩衝液に懸濁したHAワクチン(5 μ g/mL)50 μ LでまずEIAプレートの各ウエルをコーティングした。室温に2時間放置後、ツィーン20添加PBS(以下PBS-ツィーンと記す)でプレートを洗浄した。次に、非特異反応を抑制するために、1%BSAおよび0.1%NaN₃を含むPBS、100 μ Lで各ウエルをコートした。4°Cに一昼夜放置後、PBS-ツィーンで洗浄した。このウエルに適当に希釈した鼻腔洗浄液試料100 μ Lを分注し、数時間後に反応液を除去してPBS-ツィーンで洗浄した。次に各ウエルに100 μ Lの1%BSAおよび0.1%NaN₃を含むPBSで希釈したアルカリホスファターゼ標識ヤギ抗マウスIgA α 鎖特異抗体(またはアルカリホスファターゼ標識ヤギ抗マウスIgG抗体)を分注した。室温に1時間放置後に洗浄した。最後に、各ウエルに10%ジエタノールアミン緩衝液(pH9.8)に溶解したp-ニトロフェニルリン酸(1mg/mL;シグマ社製)を加えて発色させた。室温で20~30分放置後、発色をプレートリーダーを使ってOD(405nm)で測定した。

図2は実施例2で調製した減毒化コレラトキシンをアジュバントに用いたインフルエンザワクチンの、二次応答による鼻腔洗液中の抗インフルエンザHA-IgA抗体産生に対する影響を示したものである。アジュバント無添加ワクチンを鼻腔内接種したときには、抗HA-IgA抗体の力価は低かった。これに対し、減毒化コレラ

トキシン添加ワクチンで一次、二次接種したグループでは鼻腔洗液中の抗 HA-IgA 抗体価の著しい上昇が観察された。その抗体価は対照として用いた同用量の天然体コレラトキシンの場合と同等であった。

図 3 は上記試験における、血清中抗 HAIgG 抗体産生に対する影響を示したものである。減毒化トキシンは血清中の HA 抗体価をアジュバント無添加の場合よりも 15 倍程度上昇させた。しかし、抗体価は対照として用いた天然体コレラトキシンの場合の半分程度であった。これらの結果から、減毒化コレラトキシンは、例えば局所免疫増強を必要とするワクチンのアジュバントとして有用であることがわかる。

実施例 4 高度減毒化トキシンのアジュバント活性

アジュバントとして残存トキシン活性が天然体の 1/2000 以下の種々異なる減毒化コレラトキシンを用いた。実施例 2 と同様の試験を複数回実施し、マウス鼻腔洗液中の抗 HA-IgA および血中 IgG 抗体価を測定した。試験毎の抗体価を、陽性対照として用いた同用量の天然体コレラトキシンの場合の抗体価に対する相対値に換算した。この相対値を縦軸に、用いた減毒化トキシンの減毒化率（天然体に対する相対残存活性）を横軸にグラフ化した（図 4）。残存トキシン活性が天然体の 1/2000 以下 ($1/2000 \div 4^{-5.46}$) の多くの減毒化トキシンが、同用量の天然体コレラトキシンに匹敵する高い抗体産生増強作用を示す事が明らかである。特に経鼻接種による抗原特異的粘膜 IgA の増強に対して、1/2000 以下の残存トキシン活性を持つもので減毒化前のトキシンと同等、あるいはそれ以上の有効性を示すことが確認された。

実施例 5 二つのアジュバントの併用

アジュバントとしてホルマリン処理で減毒化したコレラトキシン（Y-1 細胞形態変化法による残存トキシン活性 1/1048000）およびトキシン活性の弱いことが

既に確立されている大腸菌易熱トキシン B サブユニット（未処理）を同時に使用した。実施例 3 と同様に実施し、インフルエンザウイルスに対する細胞性免疫応答を、マウス足腫脹法で測定した。結果は図 5 に示すとおりであった。大腸菌易熱トキシン B サブユニット $1\mu\text{g}$ と減毒化コレラトキシンを $0.1\mu\text{g}$ 、 $0.01\mu\text{g}$ を同時使用する条件下では、同量の減毒化コレラトキシンを単独使用した時より、免疫応答は明らかに増強された。この結果は、減毒化トキシンと別のアジュバントを同時使用する方法により、減毒化トキシンの使用量をさらに低く抑えられることを示す。

実施例 6 各種減毒化トキシンの調製と抗体産生増強作用

北里研究所製ジフテリアワクチンと百日せきワクチンを製造する方法（北里研究所編著・発行、「ワクチン製造技術教本」,1986）に準じ、それぞれ、ジフテリアトキシンと百日せきトキシンを調製した。実施例 2 と同じ方法で減毒化したこれらのトキシンをアルミニウムゲルに吸着させて実験に使用した。また、市販のブドウ球菌 α トキシン（シグマ社製）、腸炎ビブリオ耐熱トキシン（シグマ社製）を購入し、実施例 2 と同じ方法で減毒化してそのまま用いた。大腸菌易熱トキシンの組み換え変異体 LTR(7)K(N 末端から 7 番目のアルギニン残基をリジン残基に置換したものは、Komase らの方法 (K.Komase et al., Vaccine 16, 248-254, 1998) で調製した。こうして 5 種類の減毒化トキシンを得た。実施例 3 における減毒化コレラトキシンの代わりに、上記のように調製した減毒化トキシンを適当な濃度で用いる以外は実施例 3 の操作に従ってインフルエンザワクチンにおける免疫増強効果を調べた。表 3 には減毒化トキシンの残存トキシン活性の相対値（天然体に対する減毒化率）とともに、その結果を示す。

この結果から、天然トキシン、組み換え変異体トキシンのいずれでも、本発明を構成するアジュバントは経鼻接種ルートで投与されたインフルエンザワクチンに対し、免疫増強活性があることがわかる。

表 3

各種減毒化トキシンの抗体産生増強作用

| 減毒化した トキシンの種類 | 減毒化率 (1/4 ⁿ) | 接種量 (μg / マウス) | | 抗体産生 HI (2 ⁿ) |
|-----------------------------|-----------------------------|----------------|------------|---------------------------------|
| | | トキシン | インフルエンザ HA | |
| ブドウ球菌αトキシン | 6.7 | 0.5 | 2.0 | 9.0 |
| | 9.1 | 0.5 | 2.0 | 8.6 |
| 百日せきトキシン | 7.9 | 1.0 | 2.0 | 11.0 |
| | 9.3 | 1.0 | 2.0 | 10.8 |
| ジフテリアトキシン | 7.2 | 1.0 | 2.0 | 10.5 |
| 組み換え大腸菌易熱性 トキシン (LT-R7K) | 5.8 | 5.0 | 2.0 | 10.9 |
| | 9.3 | 5.0 | 2.0 | 11.8 |
| 腸炎ビブリオ菌 耐熱トキシン | 8.4 | 0.5 | 2.0 | 9.0 |
| コレラトキシン (対照) | 0.0 | 1.0 | 2.0 | 11.2 |
| 無添加 (対照) | | 0.0 | 2.0 | < 4 |

実施例 7 百日せきジフテリア破傷風混合ワクチン-減毒化コレラトキシン製剤 (点鼻剤):

百日せきジフテリア破傷風混合ワクチンと、PBS に溶解し濾過滅菌した減毒化コレラトキシン (天然体と比較したトキシン活性は約 1/100000) を混合し、20 μL 中に混合ワクチンが蛋白質窒素として 50 μg と減毒化コレラトキシン 5 μg を含むように調製した。これに防腐剤 (0.005%チメロサル) を加え、適当な容器に適量分注して、百日せきジフテリア破傷風混合ワクチン-減毒化コレラトキシン経鼻投与剤とした。本品は 10℃以下の冷暗所に保存した。

上記のように調製した百日せきジフテリア破傷風混合ワクチンおよび減毒化トキシンを含むワクチンを各群のマウスに接種し、さらに、4週間後に同量のワクチンを追加接種し、その2週間後の抗体産生を調べた。抗百日せきトキシン抗体、抗ジフテリアトキシン抗体、抗破傷風トキシン抗体の力価（国際単位）は、ワクチンのみを接種されたマウスにおいてはそれぞれ、2.0単位以下、2.0単位以下、ならびに1.5単位以下であった。一方、減毒化トキシンを含むワクチン接種群では、それぞれ、88.6、61.8、そして75.5単位であった。試験成績から、アジュバント無添加ワクチンを接種されたマウスに比べ、減毒化トキシンを含むワクチン接種群では、いずれの抗原に対しても、抗体産生量が高いことがわかる。

実施例8 破傷風ワクチン-減毒化コレラトキシン製剤（経皮剤）：

北里研究所製破傷風トキソイドを製造する方法（北里研究所編著・発行、「ワクチン製造技術教本」,1986）に準じ、破傷風トキソイドを調製し、抗原とした。実施例1および2に記載の方法でコレラトキシンならびに減毒化コレラトキシン（天然体に比較したトキシン活性は約1/2500）を調製し、アジュバントとして試験に使用した。破傷風トキソイド溶液（400Lf/ml）とコレラトキシン溶液（4mg/ml）または減毒化コレラトキシン溶液（4mg/ml）を異なる容量比で混合し、ワクチン（1mL）とした。ワクチンは、調製後直ちに布基剤（リント布、約2cm x 2cm）、に染み込ませ、免疫に用いた。

モルモット（各群5匹）を以下の通り免疫した。モルモットの背部をバリカンで刈毛し、脱毛クリームを塗布し、30分後、モルモット背部を洗った。翌日、背部に試料を塗布した布基剤を貼付し、粘着テープで固定して常法により飼育した。毎週1回、4週で合計4回貼付し、貼付開始4週間後に1回目採血した。初回免疫6週間後に5回目の貼付（ブースター）を行い、その1週間後（初回から7週間後）に2回目採血した。

血中の抗体価の測定には、破傷風抗体測定キット「化血研」を用いた。破傷風

毒素抗体価測定の結果を表 4 に示す。7 週間後、減毒化コレラトキシン添加ワクチン投与群の抗体価は、無添加ワクチン投与群（対照）より抗体価が高かった。

表 4

| 試験群 番号 | 破傷風 トキソイド (Lf/布基材) | トキシン (mg/布基材) | 4 週間後 血中抗体価 (国際単位/mL) | 7 週間後 血中抗体価 (国際単位/mL) |
|-----------|--------------------------|------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| 1 | 100 | 減毒化コレラトキシン 1.0 | 3.6 | 12.3 |
| 2 | 100 | 減毒化コレラトキシン 0.1 | 2.6 | 9.2 |
| 3 | 100 | 天然コレラトキシン 1.0 | 4.1 | 25.6 |
| 4 | 100 | 天然コレラトキシン 0.1 | 2.6 | 14.3 |
| 5 | 100 | 無添加 | 2.0 以下 | 3.1 |

実施例 9 B 型肝炎ワクチン－減毒化コレラトキシン（注射剤）：

B 型肝炎ワクチンと、PBS に溶解し濾過滅菌した減毒化コレラトキシン（天然体と比較したトキシン活性は $1/10^6$ 以下）を含む画分を混合し、1mL 中に HBs 抗原が蛋白質として $40\mu\text{g}$ と、減毒化コレラトキシン $10\mu\text{g}$ を含むように調製した。これに防腐剤（0.01%チメロサル）および安定剤（0.2%豚由来ゲラチン）を加え、適当な容器に適量分注して、B 型肝炎ワクチン－減毒化コレラトキシン注射剤とした。本品は 10°C 以下の冷暗所に保存した。

上記のように調製した B 型肝炎ワクチンをマウスに接種し、3 週間後の血中の抗体産生を調べた。その結果、アジュバント無添加ワクチンを接種されたマウスでは、受身赤血球凝集反応で、 $2^{3.6}$ 単位であったのに対し、減毒化コレラトキシンを添加したものでは $2^{5.8}$ 単位であった。

実施例 10 日本脳炎ワクチン－減毒化コレラトキシン製剤（注射剤）：

日本脳炎ワクチンと、PBS に溶解し濾過滅菌した減毒化コレラトキシン（天然体と比較したトキシン活性は $1/100000$ 以下）を混合し、1 mL 中に $10^{7.0}\text{PFU}$ 相当量の不活化日本脳炎ウイルス粒子と、減毒化コレラトキシン $2\mu\text{g}$ を含むように調製した。これに安定剤（0.2%豚製ゲラチン）を加え、適当な容器に適量分注して、

日本脳炎ワクチン-減毒化コレラトキシン注射剤とした。本品は 10°C以下の冷暗所に保存した。

上記のように調製した日本脳炎ワクチン 1 週間隔で 2 回マウスに接種し、血中の抗体価を測定した。アジュバント無添加ワクチンを接種した場合に産生される中和抗体価は $10^{1.8}$ であったのに対し、減毒化コレラトキシンを添加したものでは $10^{2.9}$ であった。

実施例 1 1 麻しん風しん混合ワクチン-減毒化コレラトキシン製剤 (点鼻剤):

麻しん風しん混合ワクチンと、PBS に溶解し濾過滅菌した減毒化コレラトキシン (天然体と比較した残存トキシン活性は約 1/28500) を混合し、20 μ L 中に各ワクチン 7 μ g 相当量のウイルス粒子と、減毒化コレラトキシンを 2.5 μ g 含むように調製した。これに安定剤 (0.2%豚製ゲラチン、0.1%グルタミン酸ナトリウム、5%乳糖) を加え、適当な容器に適量分注して、麻しん風しん混合ワクチン-減毒化コレラトキシン点鼻剤とした。本品は 10°C以下の冷暗所に保存した。

上記のように調製した麻しん風しん混合ワクチンを 3 週間隔で 2 回マウスに投与し、血中の抗体産生を測定した。その結果、アジュバント無添加ワクチンを投与した場合に産生される麻しん、風しんの ELISA 抗体価は、それぞれは、0.18、0.08 であったのに対し、減毒化コレラトキシン添加ワクチンは、各々0.34、0.42 であった。

実施例 1 2 麻しん風しん混合ワクチン-減毒化百日せきトキシン製剤 (点鼻剤):

実施例 1 0 における減毒化コレラトキシンの代わりに減毒化百日せきトキシン (実施例 6 で調製したもの、天然体と比較したトキシン活性/CHO 細胞変形試験法は 1/100000 以下)を用いる以外は実施例 1 1 の操作に従ってマウスの血中抗体価を測定した。アジュバント無添加ワクチンを投与した場合に産生される麻しん、

風しんの ELISA 抗体価は、それぞれ 0.19、0.070 であったのに対し、減毒化百日せきトキシン添加ワクチンは、0.32 および 0.16 であった。

実施例 13 ロタワクチン-減毒化組み換え大腸菌易熱トキシン製剤（経口、点鼻剤）：

ロタワクチンと、PBS に溶解し濾過滅菌した減毒化組み換え LTR(7)K (天然体と比較したトキシン活性は約 1/260000、実施例 6 と同じもの) を含む画分を混合し、20 μ L 中にロタワクチン 3.5 μ g 相当量のウイルス粒子と、減毒化組み換え LTR(7)K を 10 μ g 含むように調製した。これに防腐剤 (0.01%チメロサル) および安定剤 (0.2%豚由来ゲラチン) を加え、適当な容器に適量分注して、ロタワクチン-減毒化 LT トキシン経口剤、および点鼻剤とした。本品は 10°C 以下の冷暗所に保存した。

上記のように調製したロタワクチンを 3 週間隔で 2 回マウスに投与し、血中の抗体産生力価を測定した。点鼻接種の場合、ワクチンのみを投与した場合に産生される ELISA 抗体価は、0.072 であったのに対し、減毒化 LT トキシン添加ワクチン接種の場合は、0.40 であった。また、経口接種の場合、アジュバント無添加ワクチンを投与した場合に産生される ELISA 抗体価は、0.020 であったのに対し、減毒化 LT トキシン添加ワクチン接種の場合は、0.19 であった。

産業上の利用の可能性

以上の実施例により次のことが明らかである。

1. 減毒化トキシンで構成される本発明のアジュバントは、共存するインフルエンザワクチン抗原などに対する抗体産生を増強する。
2. 本発明によるアジュバントとともにワクチン抗原を経鼻接種する場合、血中の抗体産生だけでなく局所の抗体産生も増強される。
3. 本発明のアジュバントは、残存トキシン活性が検出限界以下のレベルまで低

下している場合にも、抗原と共存する場合、同じ使用量で天然体トキシンと同程度の免疫増強作用を示す。

4. 本発明のアジュバントと公知の他のアジュバントとを併用した場合、相乗的に抗体産生が増強される場合がある。換言すれば、本発明のアジュバントと適切な組み合わせのアジュバントと併用する方法により、ワクチン抗原の摂取量を減少させることができ、副反応の起きる可能性を低減させることができる。

このように、本発明による減毒化トキシンを含むワクチン製剤は、安全性の高いアジュバントとして有用である。更に本発明のアジュバントを利用したワクチンは、安全性が高い上に経鼻接種、経皮接種あるいは経口接種といった公知の方法では効果的な免疫を期待しにくい接種ルートであっても、十分な免疫増強活性を持った優れたワクチンとなる。加えて本発明に基づくワクチンは、実施例で示したように局所免疫や細胞性免疫の誘導能に優れるなど、公知のアジュバントでは達成が困難であった課題を解決するものである。加えて本発明は、天然体のトキシンでさえ安全なアジュバントとして利用することを可能とする。そのためトキシンの変異体を作り出すというアプローチに比べて、はるかに容易にワクチンへの応用を実現することができる。

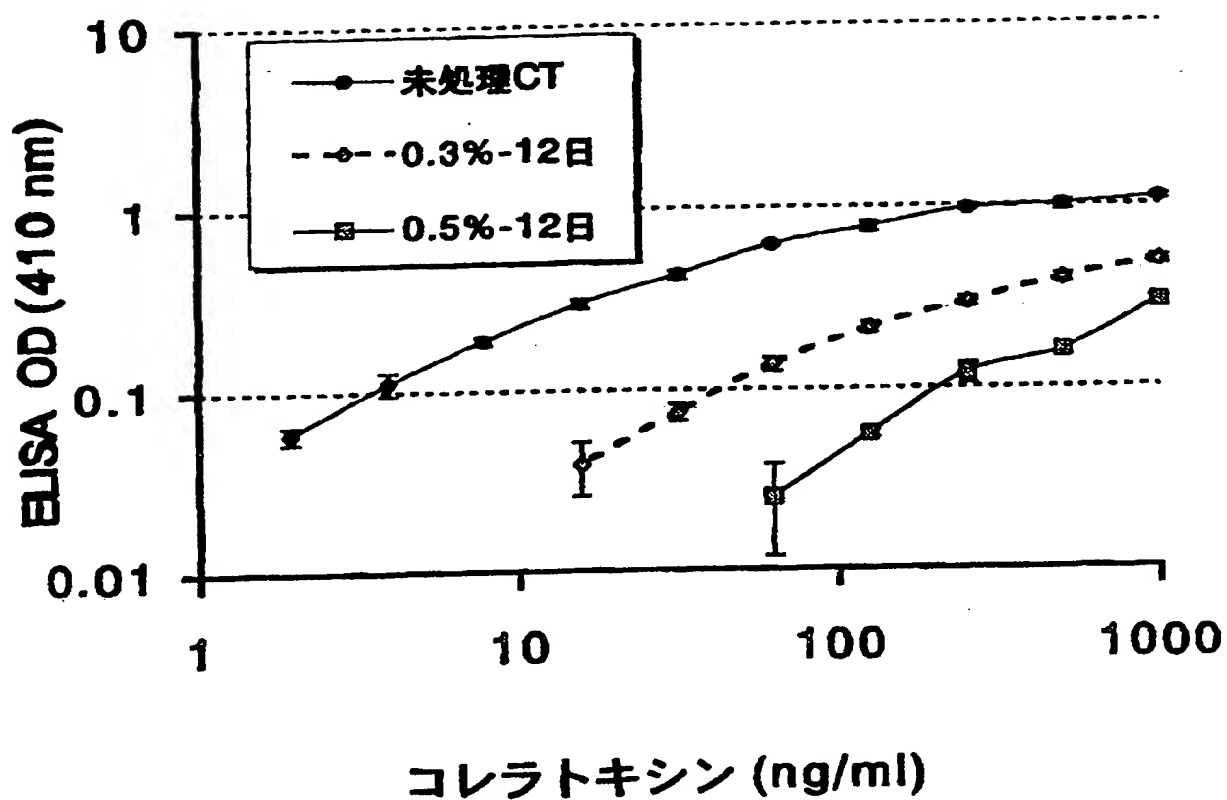
請求の範囲

1. 天然のトキシンを構成するアミノ酸配列中、セリン残基、グルタミン酸残基、およびリジン残基を保持しているトキシン、またはそのサブユニットを減毒化し、残存トキシン活性を天然体の 1/2000 以下とした減毒化トキシンを含むアジュバント。
2. トキシンが、天然トキシンのアミノ酸配列に対し 1、若しくは複数のアミノ酸を置換、挿入、欠失および／または付加したアミノ酸配列によって構成された、アジュバント活性を持つ変異体である請求項 1 に記載のアジュバント。
3. トキシンが天然のトキシンである請求項 1 に記載のアジュバント。
4. トキシンが細菌トキシンである請求項 1 - 3 のいずれかに記載のアジュバント。
5. トキシンが、コレラトキシン、百日せきトキシン、病原性大腸菌易熱性トキシン、ブドウ球菌 α トキシン、ブドウ球菌 β トキシン、および腸炎ビブリオ菌耐熱性溶血トキシンで構成される群から選択される少なくとも 1 つのトキシンである請求項 4 に記載のアジュバント。
6. トキシンが天然コレラトキシンであり、ホルマリン処理によって減毒化しそのトキシン活性を 1/2000 以下とした請求項 5 に記載のアジュバント。
7. トキシン活性が 1/10000 以下である請求項 6 に記載のアジュバント。
8. 請求項 1 - 7 のいずれかに記載のアジュバントと免疫抗原を含むワクチン製剤。
9. 経鼻接種のためのものである請求項 8 に記載のいずれかのワクチン製剤。
10. 経口接種のためのものである請求項 8 に記載のいずれかのワクチン製剤。
11. 経皮接種のためのものである請求項 8 に記載のいずれかのワクチン製剤。
12. 免疫抗原が、インフルエンザウイルス、ロタウイルス、麻疹ウイルス、

風しんウイルス、おたふくかぜウイルス、エイズウイルス、百日せき菌、ジフテリア菌、ヘリコバクター・ピロリ菌、出血性大腸菌(EHEC)、クラミジア原虫、マイコプラズマ原虫、マラリア原虫、コクシジウム原虫、および住血吸虫で構成される群から選択される単一または複数の病原微生物の抗原である請求項 8 に記載のいずれかのワクチン製剤。

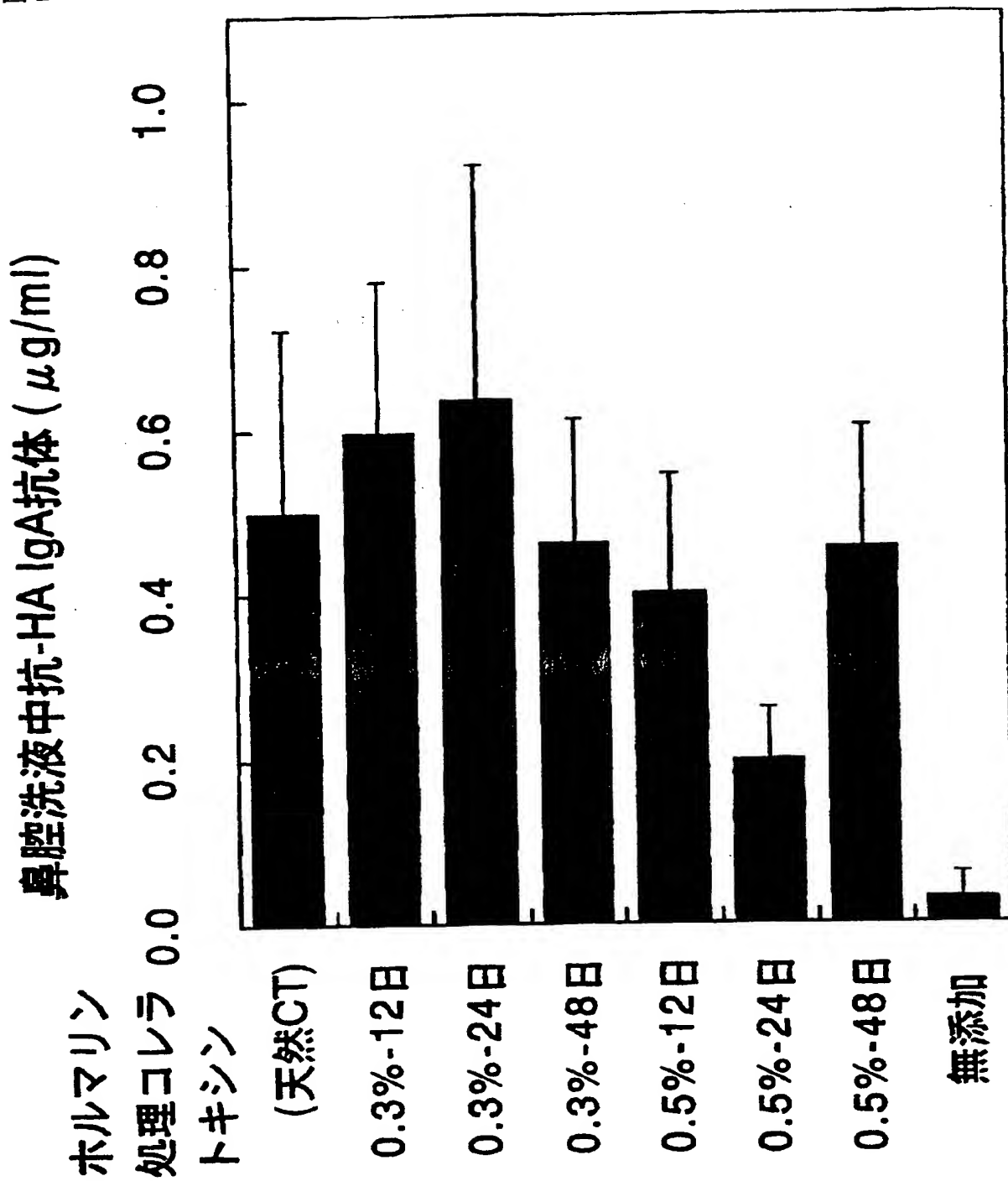
1/5

図 1



THIS PAGE BLANK (USPTO)

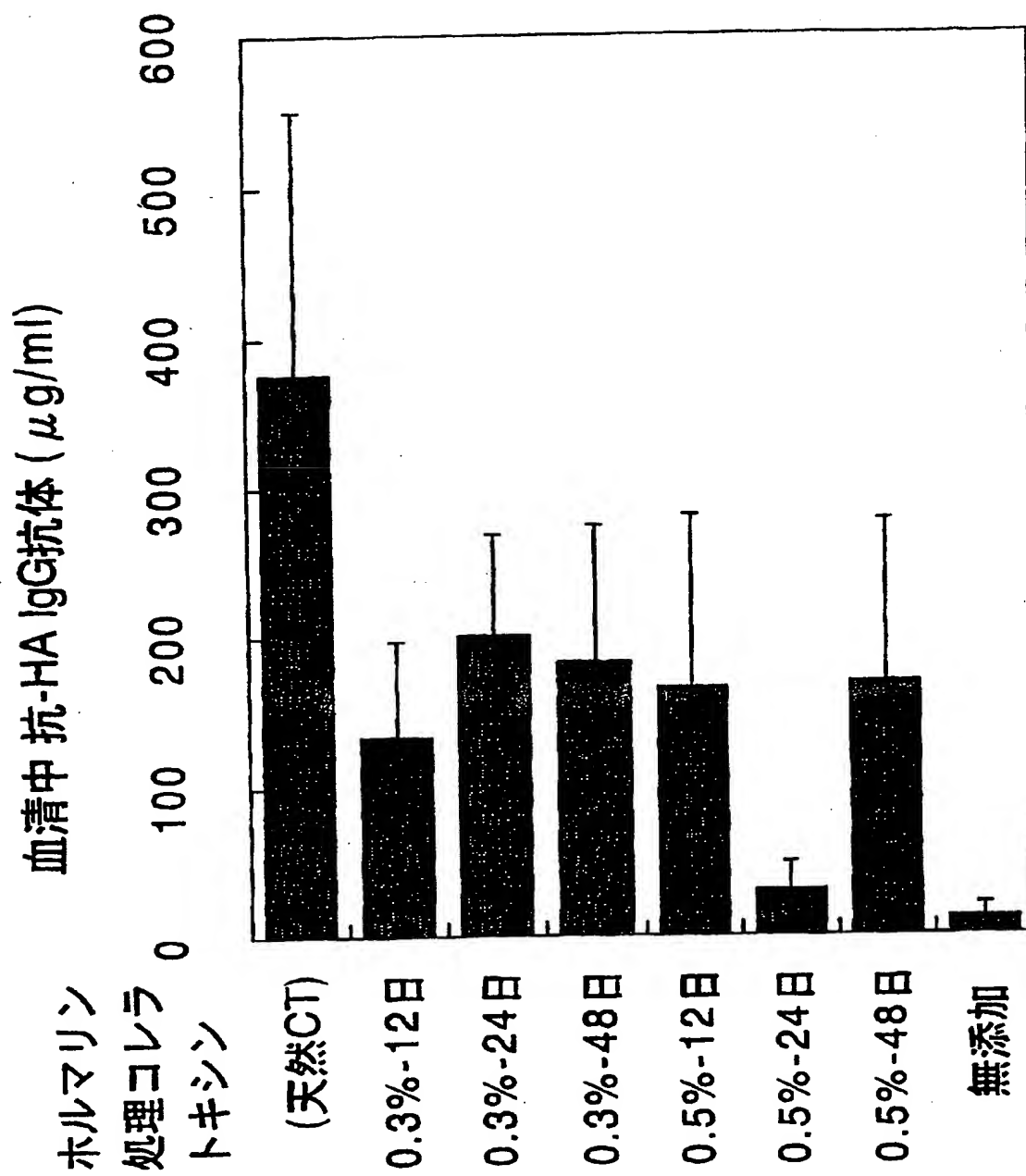
図 2



THIS PAGE BLANK (USPTO)

3/5

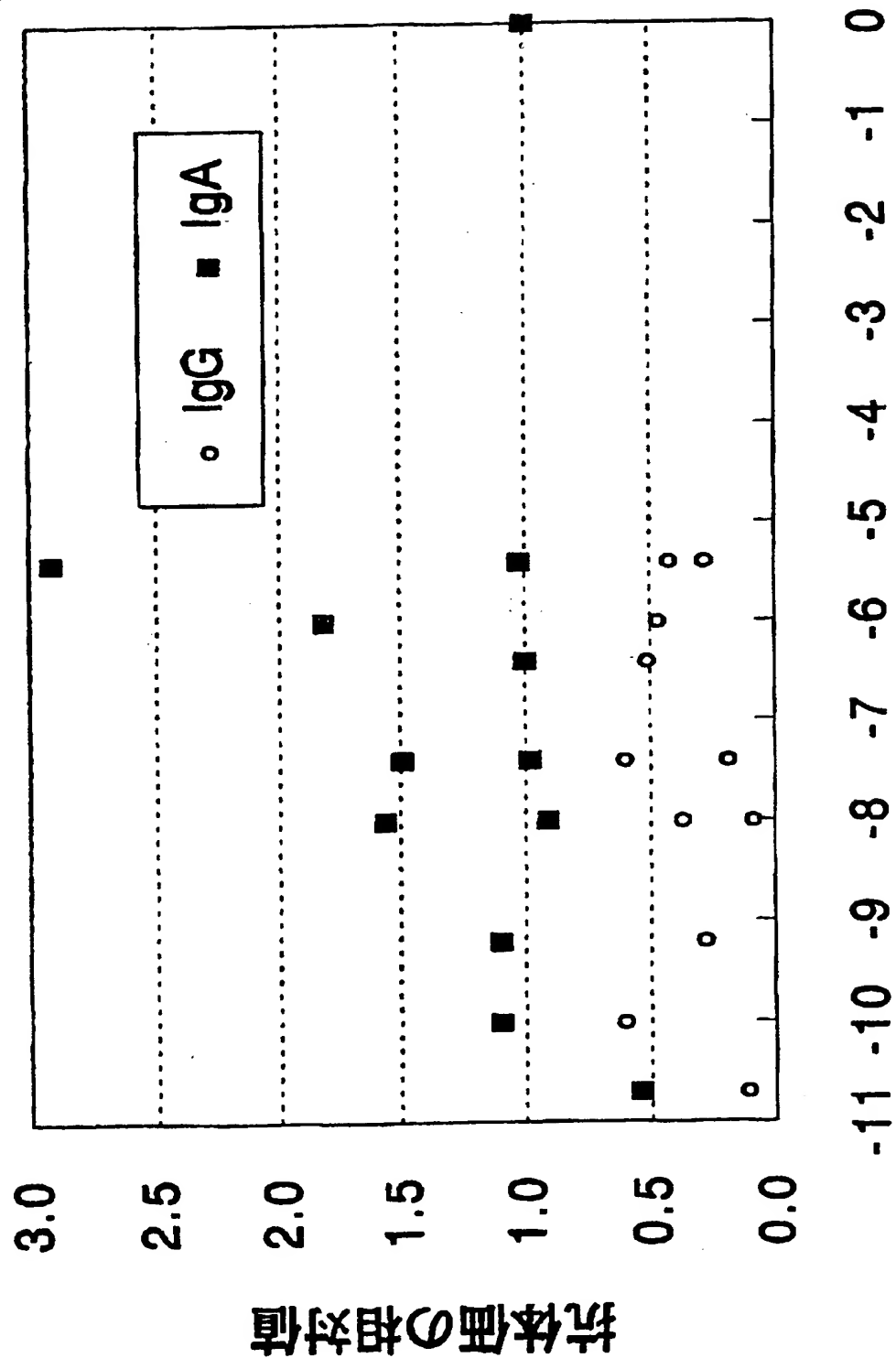
図 3



THIS PAGE BLANK (USPTO)

4/5

図 4

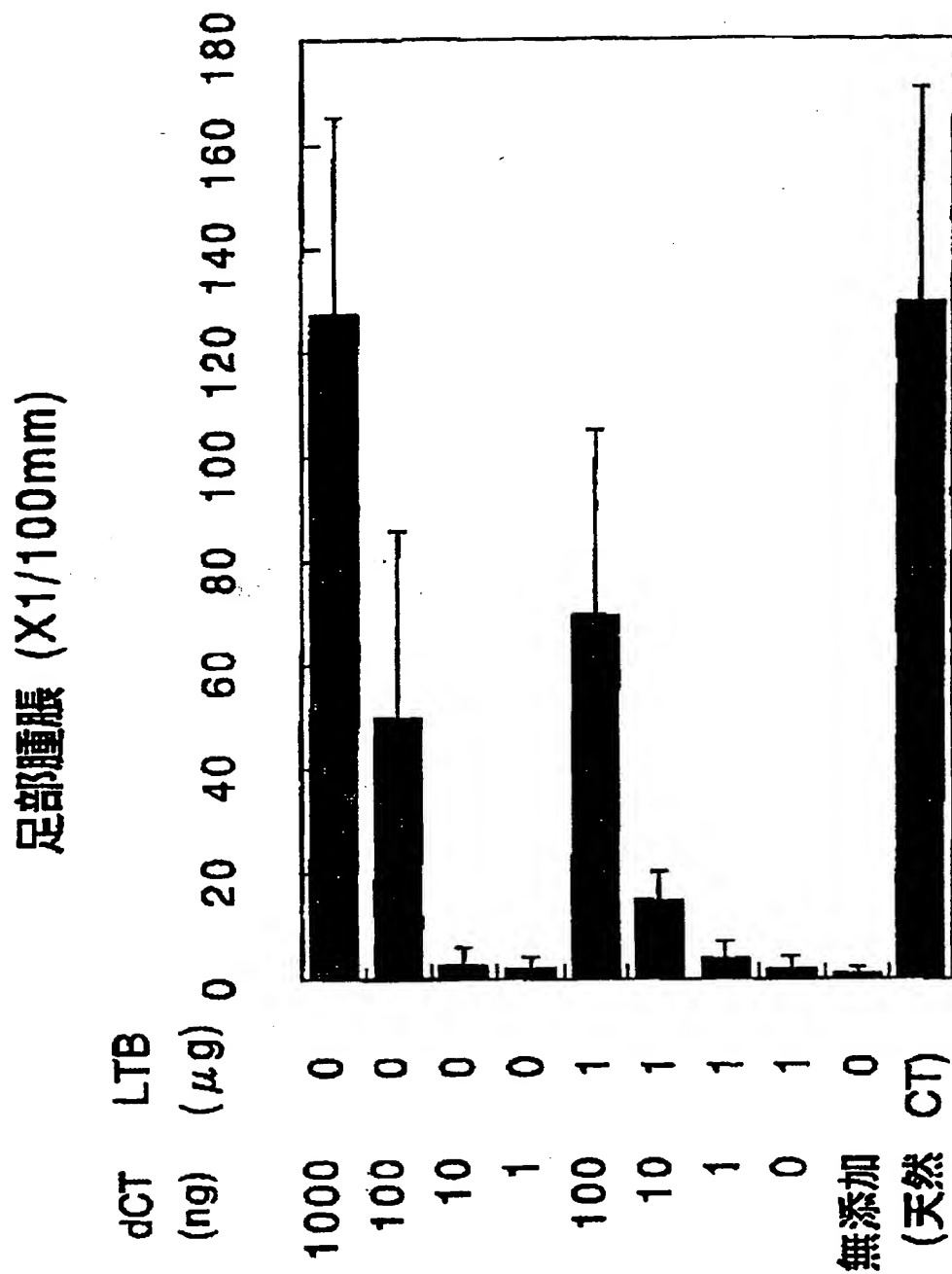


残存トキシン活性の相対値 (4^n)
(減毒化トキシン/天然トキシン)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

5 / 5

図 5



THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/05789

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ A61K39/39, 39/145, 39/15, 39/165, 39/20, 39/21,
39/10, 39/07, 39/02, 39/108, 39/118, 39/00, 39/015, 39/012,
39/116, 39/295, A61P31/04, 31/12, 31/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ A61K39/39, 39/145, 39/15, 39/165, 39/20, 39/21,
39/10, 39/07, 39/02, 39/108, 39/118, 39/00, 39/015, 39/012,
39/116, 39/295, A61P31/04, 31/12, 31/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAPLUS (STN) , MEDLINE (STN) , WPIDS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| X | LIANG, X., et al., 'Cholera toxin as a mucosal adjuvant: Glutaraldehyde treatment dissociates adjuvant activity from toxicity' J. Immunol., 1989, Vol.143, No.2, pp.484-490, Full text | 1 - 12 |
| X | WO, 98/18928, A1 (CHIRON S.P.A.), 07 May, 1998 (07.05.98), Figs. 3 to 9, (B) & EP, 941333, A1 | 1-5, 7-12 |
| X Y | WO, 98/42375, A1 (CHIRON CORPORATION), 01 October, 1998 (01.10.98), page 4, line 1 to page 5, line 23; page 7, line 26 to page 9, line 8; page 17, line 24 to page 20, line 12; Examples 1-5 & AU, 9865713, A | 1 - 8 9 - 12 |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
21 January, 1999 (21.01.99)

Date of mailing of the international search report
01 February, 2000 (01.02.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/05789

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| X Y | WO, 95/34323, A2 (CONNAUGHT LABORATORIES LIMITED), 21 December, 1995 (21.12.95), page 7, line 30 to page 11, line 25; Example 11; Tables 1a, 1b; Figs. 5,6 & EP, 764029, A1 | 1-5, 7, 8 9 - 12 |
| Y | WO, 95/17211, A1 (BIOCINE S.P.A.), 29 June, 1995 (29.06.95), page 5, line 9 to page 12, line 19; Figs. 1a-5 & EP, 732937, A1 & JP, 10-500099, A | 1 - 12 |
| Y | DE GRAVE, D., et al., "Enhancement of the humoral immunity against HBSAG by Pertussis toxin", Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent, 1989, Vol. 54, No. 4b, pp.1553-1555, Full text | 1 - 12 |
| A | RYAN, M., et al., "Pertussis toxin potentiates Th1 and Th2 responses to co-injected antigen: adjuvant action is associated with enhanced regulatory cytokine production and expression of the co-stimulatory molecules B7-1, B7-2, and CD28" Int. Immunol., May 1998, Vol. 10, No. 4, pp. 651-662, Full text | 1 - 12 |

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁷ A61K39/39, 39/145, 39/15, 39/165, 39/20, 39/21,
39/10, 39/07, 39/02, 39/108, 39/118, 39/00, 39/015, 39/012,
39/116, 39/295, A61P31/04, 31/12, 31/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁷ A61K39/39, 39/145, 39/15, 39/165, 39/20, 39/21,
39/10, 39/07, 39/02, 39/108, 39/118, 39/00, 39/015, 39/012,
39/116, 39/295, A61P31/04, 31/12, 31/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), WPIDS (STN)

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|--|------------------|
| X | LIANG, X., et al., 'Cholera toxin as a mucosal adjuvant: Glutaraldehyde treatment dissociates adjuvant activity from toxicity' J. Immunol., 1989, Vol. 143, No. 2, pp. 484-490, 全文参照 | 1 - 12 |
| X | WO, 98/18928, A1 (CHIRON S.P.A.), 7. 5月. 1998 (07. 05. 98), 図3-9 (B)参照 & EP, 941333, A1 | 1-5, 7-12 |

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

21. 01. 99

国際調査報告の発送日

01 February 2000 (01.02.00)

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

大宅 郁治

4 C

9639

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

| C (続き) . 関連すると認められる文献 | | |
|-----------------------|--|---------------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
| X Y | WO, 98/42375, A1 (CHIRON CORPORATION), 1. 10月. 1998 (01. 10. 98), 第4頁第1行—第5頁第23行, 第7頁第26行—第9頁第8 行, 第17頁第24行—第20頁第12行及び実施例1—5 & AU, 9865713, A | 1 - 8 9 - 12 |
| X Y | WO, 95/34323, A2 (CONNAUGHT LABORATORIES LIMITED), 21. 12月. 1995 (21. 12. 95), 第7頁第30行—第11頁第25行, 実施例11, 表1a, 1b 及び図5, 6 & EP, 764029, A1 | 1-5, 7, 8 9 - 12 |
| Y | WO, 95/17211, A1 (BIOCINE S.P.A.), 29. 6月. 1995 (29. 06. 95), 第5頁第9行—第12頁第19行及び図1a—5 & EP, 732937, A1 & JP, 10-500099, A | 1 - 12 |
| Y | DE GRAVE, D., et al., 'Enhancement of the humoral immunity against HBSAG by Pertussis toxin' Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent, 1989, Vol.54, No.4b, pp.1553-1555, 全文参照 | 1 - 12 |
| A | RYAN, M., et al., 'Pertussis toxin potentiates Th1 and Th2 responses to co-injected antigen: adjuvant action is associated with enhanced regulatory cytokine production and expression of the co-stimulatory molecules B7-1, B7-2, and CD28' Int. Immunol., May 1998, Vol.10, No.4, pp.651- 662, 全文参照 | 1 - 12 |